



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**Sede Sur**

**Departamento de Farmacobiología**

**Caracterización electrofisiológica del propilparabeno y su efecto en la  
actividad epileptiforme**

**Tesis que presenta:**

M. en C. Leonardo Lara Valderrábano

**Para obtener el grado de:**

**Doctor en Ciencias en**

**Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

**Directores de la Tesis:** Dr. Emilio Javier Galván Espinosa

Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta

**Ciudad de México**

**Marzo, 2017**

## **Agradecimientos**

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio 8 y el Laboratorio 9 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Este proyecto de investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Luisa L. Rocha Arrieta y el Dr. Emilio J. Galván Espinosa.

Este trabajo se pudo realizar gracias al apoyo de la beca de doctorado 377269/243422 (CVU/Becario) y el apoyo económico a los proyectos 220365, CB-2011-01-166241 y INFR-2012-01-187757, otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Gracias a la Dra. Luisa Rocha por la acertada dirección e instrucción durante esta investigación.

Agradezco al Dr. Emilio Galván, que por sus conocimientos y consejo hicieron posible este trabajo.

A ambos por su capacidad, profesionalismo, conocimientos, rigor y paciencia para realizar una investigación de calidad en equipo.

A los miembros del sínodo por sus consejos y pertinentes correcciones:

- Dra. Janet Murbartián por sus aportaciones teóricas y prácticas durante todo el proceso de investigación.
- Dra. Sandra Orozco por su gran apoyo personal y académico en la realización de este trabajo.
- Dr. Rodolfo Delgado-Lezama por sus propuestas pertinentes y amables cuestionamientos, enriquecieron mi formación como científico.
- Dr. Alonso Fernández-Guasti, porque sus conocimientos desde otra perspectiva enriquecen cualquier proyecto.

Al Tec. Juan Javier López por su asistencia técnica en la elaboración de este trabajo y su valiosa amistad.

A la Q.F.I. Francia Carmona por su excelente ayuda en el Laboratorio 8, trato impecable y amistad sincera.

Al Lic. Héctor Vázquez y a la M. en BEI María del Pilar Quinteros Carrillo por su valioso apoyo académico.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio 8: César, Francia, Ángeles, Angélica, Víctor, Nabila, Lupita, Cindy, Marysol e Ivette.

También a todos mis compañeros y amigos del Laboratorio 9: Cindy, Melissa, Monserrat, Ixchel, Paty, Gabriel, Carolina, Carmen, Felipe, Martín, Eduardo, Jesús y Ernesto.

A todos los colegas y amigos del Departamento: Heber, Ireri, Luis, Eduardo, Omar, Diana, Franco, Fabiola, Lula, Karla, Elisa, Helena, Víctor y Lizbeth.

Con ustedes el trabajo fue entretenido y enriquecedor, les agradezco todo lo que aprendí personal y académicamente de cada uno.

A todo el personal técnico, administrativo, de mantenimiento y vigilancia del Cinvestav Sede Sur.

A todos los profesores del Departamento de Farmacobiología por haberme formado científicamente.

## **Dedicatorias**

A mis padres por su fuerza, apoyo permanente, confianza y amistad. Por todo el esfuerzo invertido, el aliento y consejo para lograr nuestras metas. A mi hermano por su perseverancia y empeño.

A mis abuelos por todas las enseñanzas y su gran ejemplo de vida.

A toda mi gran familia y valiosos amigos por su apoyo y cariño.

Para Ivette, mi compañera incondicional, por tu apoyo personal y académico en todo momento. Mi amor, respeto y admiración para siempre.

## Índice general

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Parabenos .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Propilparabeno .....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Características.....	3
1.2.2. Efectos adicionales del PPB.....	8
1.2.2.1. Estrogénico .....	8
1.2.2.2. Relación con el cáncer .....	8
1.2.2.3. PPB y modulación de canales iónicos .....	9
1.2.3. Propilparabeno y su efecto cardioprotector, neuroprotector y anticonvulsivo .....	11
1.2.4. Epilepsia y fármacos antiepilépticos .....	12
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>14</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
4.1. Objetivo general .....	14
4.2. Objetivos particulares.....	15
<b>5. METODOLOGÍA GENERAL .....</b>	<b>15</b>
5.1. Procedimiento experimental .....	15
5.2. Procedimiento electrofisiológico.....	16
5.3. Análisis estadístico.....	17
<b>6. EXPERIMENTO 1. EFECTO DEL PPB EN LA ACTIVIDAD EPILEPTIFORME INDUCIDA POR 4-AMINOPIRIDINA .....</b>	<b>18</b>
6.1. Introducción.....	18
6.2. Justificación del experimento .....	21
6.3. Metodología particular .....	21
6.3.1. Procedimiento experimental .....	22

<b>6.4. Resultados</b> .....	<b>23</b>
6.4.1.1. Grupo de LCRa .....	23
6.4.1.2. Actividad epileptiforme inducida por 4-AP .....	25
6.4.1.3. Efecto de la aplicación del vehículo en la actividad epileptiforme ..	27
6.4.1.1. Efecto de la fenitoína en la actividad epileptiforme .....	27
6.4.1.2. Efecto del PPB en la actividad epileptiforme.....	30
<b>6.5. Discusión</b> .....	<b>35</b>
<b>7. EXPERIMENTO 2. EFECTO DEL PPB SOBRE LA EXCITABILIDAD DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1</b> .....	<b>38</b>
<b>7.1. Introducción</b> .....	<b>38</b>
7.1.1. Propiedades pasivas de la membrana y excitabilidad intrínseca neuronal	38
7.1.2. Propiedades activas de la membrana y excitabilidad neuronal .....	40
7.1.2.1. Disparo repetitivo sostenido (DRS) .....	40
7.1.2.2. Dinámica del potencial de acción.....	41
<b>7.2. Justificación del experimento</b> .....	<b>43</b>
<b>7.3. Metodología particular</b> .....	<b>43</b>
<b>7.4. Resultados</b> .....	<b>45</b>
7.4.1. Caracterización de las neuronas registradas.....	45
7.4.1. Efecto del PPB sobre las propiedades pasivas de la membrana.....	45
7.4.1.1. Resistencia de entrada.....	46
7.4.1.2. Constante de tiempo de la membrana ( $\tau_m$ ).....	47
7.4.2. Efecto del PPB sobre excitabilidad intrínseca neuronal.....	48
7.4.2.1. Efecto del PPB en la corriente rebase.....	48
7.4.2.2. Efecto del PPB sobre el Disparo Repetitivo Sostenido (DRS) .....	49
7.4.2.3. Efecto del PPB en el “sag” activado por hiperpolarización.....	54
7.4.2.4. Efecto del PPB sobre el Post-Potencial Hiperpolarizante (PPH)....	58
7.4.2.5. Efecto del PPB sobre la dinámica del PA.....	61
7.4.2.6. Efecto del PPB aplicado intracelularmente por difusión .....	67
<b>7.5. Discusión</b> .....	<b>69</b>
<b>8. EXPERIMENTO 3. EFECTO DEL PPB SOBRE LAS CORRIENTES DE NA<sup>+</sup></b>	<b>72</b>
<b>8.1. Introducción</b> .....	<b>72</b>
8.1.1. Estructura y distribución del canal Nav .....	72
8.1.2. Estados funcionales.....	73

8.1.3.	Corriente persistente de Na <sup>+</sup> .....	74
<b>8.2.</b>	<b>Justificación del experimento .....</b>	<b>74</b>
<b>8.3.</b>	<b>Metodología particular .....</b>	<b>75</b>
<b>8.4.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>75</b>
8.4.1.	Efecto del PPB en la amplitud de la corriente de Na <sup>+</sup> .....	75
8.4.2.	Efecto del PPB en estado de activación del canal.....	76
8.4.3.	Efecto del PPB en el estado de inactivación del canal .....	77
8.4.4.	Efecto del PPB en la recuperación de la inactivación .....	79
8.4.5.	Efecto del PPB sobre la corriente persistente de Na <sup>+</sup> .....	79
<b>8.5.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>81</b>
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>83</b>
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>89</b>
<b>11.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>91</b>



## Índice de figuras

Figura 1. Estructura molecular del propilparabeno (PPB) .....	4
Figura 2. Diseño experimental y análisis de la actividad epileptiforme .....	22
Figura 3. Actividad espontánea durante la perfusión de LCRa normal. ....	24
Figura 4. Registro de la actividad espontánea durante la inducción de actividad epileptiforme por la aplicación de 4-AP .....	26
Figura 5. Efecto del DMSO (vehículo) en la actividad epileptiforme .....	28
Figura 6. Efecto de la PHT en el patrón de actividad epileptiforme.....	29
Figura 7. Efecto del PPB (200 $\mu$ M) en la actividad epileptiforme inducida por 4-AP .....	31
Figura 8. Supresión de la actividad epileptiforme por la aplicación de PPB (500 $\mu$ M).....	33
Figura 9. Análisis de gráfica de fase del Potencial de Acción .....	42
Figura 10. Morfología y PMR de las neuronas piramidales registradas .....	46
Figura 11. Propiedades pasivas de la membrana de las neuronas piramidales de la región CA1 .....	47
Figura 12. El PPB aumenta en la corriente reobase .....	49
Figura 13. Efecto del PPB sobre el DRS de neuronas piramidales de la región CA1 .....	52
Figura 14. El PPB no afecta el “sag” activado por hiperpolarización.....	55
Figura 15. El PPB no modula la $I_h$ en las neuronas piramidales de CA1 .....	57
Figura 16. El PPB no tiene efecto en la PPH post tren de disparos.....	59
Figura 17. El PPB no tiene efecto en la PPH post AP .....	61
Figura 18. El PPB modifica la dinámica del PA e induce un efecto uso-dependiente .....	66
Figura 19. Efecto del PPB aplicado por diálisis intracelular y su aplicación posterior en el LCRa .....	68
Figura 20. Efecto del PPB en la corriente de $Na^+$ .....	77
Figura 21. Efecto del PPB en la activación, inactivación y recuperación del canal $Na_v$ .....	78
Figura 22. Efecto del PPB en la $I_{NaP}$ .....	80

## Índice de tablas

Tabla 1. Sinónimos, traducciones, nombres alternativos, nombres comerciales (™) y códigos en bases de datos para el Propilparabeno (PPB) .....	6
Tabla 2. Dosis tóxicas del PPB reportadas .....	7
Tabla 3. Modelos de inducción de actividad epileptiforme <i>in vitro</i> .....	20
Tabla 4. Promedio del número de potenciales de acción contabilizados durante 5 minutos, para cada grupo en cada condición experimental .....	32
Tabla 5. Promedio del número de los EPSPs y su amplitud para cada grupo en cada condición experimental .....	34
Tabla 6. Propiedades pasivas de la membrana, corriente reobase y frecuencia de disparo en condiciones control y en la presencia de PPB a concentraciones crecientes.....	53
Tabla 7. Efecto del PPB en la PPH que sigue a un tren de disparos y la que sigue al PA individual.....	60
Tabla 8. Comparación del umbral y las propiedades del PA individual de las neuronas piramidales de la región CA1 en condiciones control y con la aplicación de PPB, con la inyección de 1x reobase.....	63
Tabla 9. Comparación de las propiedades del PA individual de las neuronas piramidales de la región CA1 en condiciones control y con la aplicación de PPB, con la inyección de 2x reobase.....	65

## Lista de abreviaturas

<b><math>\mu\text{M}</math></b>	micromolar
<b>4-AP</b>	4-Aminopiridina
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ADD</b>	<i>Anticonvulsant Drug Development</i> ; Desarrollo de fármacos anticonvulsivos
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CA1</b>	<i>Cornu Amomnis 1</i> ; Asta o cuerno de Amón Área 1
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CA3</b>	<i>Cornu Amomnis 3</i> ; Asta o cuerno de Amón Área 3
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de calcio
<b>CBZ</b>	Carbamazepina
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de cadmio
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva 50
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria 50
<b>CsCl</b>	Cloruro de cesio
<b>CsOH</b>	Hidróxido de cesio
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal 50
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DRS</b>	Disparo repetitivo sostenido
<b>dV/dt</b>	Derivada del voltaje con respecto al tiempo
<b>DZP</b>	Diazepam
<b>EEG</b>	Electroencefalograma
<b>EGTA</b>	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i> ; Ácido tetra acético de etilen glicol
<b>EPSP</b>	Potenciales postsinápticos excitatorios
<b>FAE</b>	Fármaco antiepiléptico
<b>G</b>	Conductancia
<b>G<sub>max</sub></b>	Conductancia máxima
<b>GRD</b>	Ganglio de la raíz dorsal
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato

<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetaanesulfónico
<b>HCN</b>	Canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos
<b>Hz</b>	Hertz
<b>I-F</b>	Curva corriente-frecuencia
<b><math>I_h</math></b>	Corriente $I_h$
<b><math>I_{KCa}</math></b>	Corrientes de potasio dependientes de calcio
<b><math>I_{NaP}</math></b>	Corriente persistente de sodio
<b><math>K^+</math></b>	Potasio
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>KOH</b>	Hidróxido de potasio
<b>LCRa</b>	Líquido cefalorraquídeo artificial
<b>LTG</b>	Lamotrigina
<b>MES</b>	Test de electrochoque máximo
<b><math>Mg^+</math></b>	Magnesio
<b><math>MgCl_2</math></b>	Cloruro de magnesio
<b><math>MgSO_4</math></b>	Sulfato de magnesio
<b>MscL</b>	Canal mecanosensible de gran conductancia bacteriano
<b>mV</b>	milivoltios
<b>mV/ms</b>	milivoltios por milisegundo
<b><math>M\Omega</math></b>	Megaohmios
<b><math>Na^+</math></b>	Sodio
<b><math>Na_2HPO_4</math></b>	Fosfato dibásico de sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b><math>NaHCO_3</math></b>	Bicarbonato de sodio
<b><math>Na_v</math></b>	Canales de $Na^+$ dependientes de voltaje
<b>PA</b>	Potencial de acción
<b>pA</b>	picoamperios
<b>PAs</b>	Potenciales de acción
<b>PDS</b>	Despolarización paroxística
<b>PHB</b>	Fenobarbital

<b>PHT</b>	Fenitoína
<b>PM</b>	Potencial de membrana
<b>PMR</b>	Potencial de membrana en reposo
<b>PPB</b>	Propilparabeno
<b>PPH</b>	Post-potencial hiperpolarizante
<b>R<sub>N</sub></b>	Resistencia de entrada
<b>SE</b>	<i>Status Epilepticus</i>
<b>SN</b>	Sistema nervioso
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SO</b>	<i>stratum oriens</i>
<b>SP</b>	<i>stratum pyramidale</i>
<b>SR</b>	<i>stratum radiatum</i>
<b><math>\tau_m</math></b>	Constante de tiempo de la membrana
<b>TRPA1</b>	Transient Receptor Potential Cation Channel, subfamily A, member 1; Receptores de potencial transitorio de ankirina 1
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina
<b>V<sub>m</sub></b>	Potencial de membrana
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima de ascenso
<b>VPA</b>	Valproato de sodio

## Resumen

La epilepsia es un trastorno de alta prevalencia y con un porcentaje de pacientes que no responden adecuadamente al tratamiento con fármacos antiepilépticos convencionales. Por ello, se siguen desarrollando fármacos para el control de la epilepsia. En el presente estudio se investigó el efecto del propilparabeno (PPB), un conservador ampliamente utilizado en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos, evaluando su efecto en: a) la actividad epileptiforme inducida por 4-aminopiridina; b) la excitabilidad intrínseca neuronal; c) las corrientes entrantes de sodio. Dichos parámetros se evaluaron *in vitro* en neuronas piramidales de CA1, usando técnicas estándar de *patch-clamp* en las modalidades de fijación de corriente y de voltaje. Los resultados mostraron que el PPB suprimió reversiblemente la actividad epileptiforme en las neuronas registradas. Efecto que corrobora las predicciones hechas *in silico* donde se propone un efecto anticonvulsivo del PPB. Además, explicando el efecto atenuador de la actividad convulsiva observado en otros modelos animales *in vivo*. Para esclarecer este efecto exploramos los efectos del PPB en la excitabilidad neuronal. La aplicación de PPB en el baño suprimió el disparo y modificó la dinámica de los potenciales de acción individuales de una manera uso-dependiente. Por el contrario, los efectos moduladores del PPB no se observaron cuando este fue aplicado intracelularmente por difusión. Adicionalmente, para esclarecer el mecanismo de acción que explica la supresión de la actividad epileptiforme y la reducción en la excitabilidad neuronal, analizamos los efectos del PPB en las corrientes de Na<sup>+</sup>. Los resultados demostraron que el PPB redujo la amplitud de la corriente de inactivación rápida, causó un recorrimiento de la inactivación en dirección a la hiperpolarización, retrasó marcadamente la recuperación de la inactivación del canal y suprime efectivamente la corriente de sodio persistente. Estos resultados en conjunto demostraron que el PPB suprime la actividad epileptiforme al reducir la excitabilidad intrínseca neuronal por medio de la modulación de corrientes de Na<sup>+</sup>. Nuestros resultados indican que el PPB comparte mecanismo de acción con anestésicos locales, fármacos anticonvulsivos y anti arrítmicos. Por lo cual puede ser considerado como un compuesto antiepiléptico efectivo.

## Abstract

Epilepsy is a highly prevalent neurological disorder. Additionally, a percentage of patients do not respond to conventional antiepileptic drugs. Therefore, drugs for epilepsy control are still being developed. In the present study, the effect of propylparaben (PPB), an antimicrobial preservative widely used in food, cosmetics, and pharmaceuticals, was evaluated in: a) the epileptiform activity induced by 4-aminopyridine; b) neuronal intrinsic excitability; c) sodium currents of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. Parameters evaluated in hippocampal CA1 pyramidal neurons using *in vitro* standard patch clamp techniques in the current- and voltage-clamp modes. Results indicated that PPB reversibly suppressed the epileptiform activity in registered neurons. This may explain predictions of Virtual screening methodologies that projected anticonvulsant activity of PPB that was later confirmed *in vivo*. Also, explaining the attenuation of convulsive activity in some animal models and exerting neuroprotection. To clarify this effect, we further explored the effects of PPB on the excitability of pyramidal CA1 hippocampal neurons. Bath perfusion of PPB modified the action potential kinetics, and higher concentrations of PPB suppressed the spike activity in a use-dependent manner. Nevertheless, the modulatory effects of PPB did not occur when PPB was internally applied by whole-cell dialysis. Furthermore, to elucidate the anticonvulsive and the reduction of excitability effects, we analyzed PPB modulation of Na<sup>+</sup> currents. Results demonstrated that this compound reduced the fast-inactivating sodium current amplitude, causing a hyperpolarizing shift in the inactivation curve, and markedly delayed the sodium channel recovery from the inactivation state. Also, PPB effectively suppressed the persistent sodium current. Together these results indicate that PPB suppresses epileptiform activity reducing CA1 neuronal excitability by modulating voltage-dependent sodium channels. The mechanistic basis of this effect is a marked delay in the recovery from inactivation state of the voltage sensitive sodium channels. Our results indicate that similar to local anesthetics and anticonvulsant drugs that act on sodium channels, PPB acts in a use-dependent manner. Therefore, PPB may represent an effective antiepileptic compound.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Parabenos

El término “parabeno” es una abreviación de ácido para-hidroxibenzoico (en inglés *paraben* y *para-hydroxybenzoic acid*, respectivamente) y se denomina parabenos a la familia de compuestos que comprende a los ésteres del ácido 4-hidroxibenzoico. Los primeros datos respecto a la actividad antimicrobiana de éstos compuestos, fueron reportados por Sabalitschka en 1924 (Aalto et al., 1953; Block, 2001). Posteriormente, en 1930 fueron introducidos a la industria por primera vez, siendo empleados como conservadores desde entonces (Cashman y Warshaw, 2005).

Los parabenos más comúnmente utilizados son: el metilparabeno, propilparabeno y butilparabeno (Andersen, 2008); a menudo se combinan entre ellos (y con otros conservadores) para aumentar la protección contra un mayor rango de microorganismos (Soni et al., 2005).

Los miembros de esta familia de compuestos han sido utilizados para una gran variedad de aplicaciones contra microorganismos debido a sus características fisicoquímicas, por ejemplo: son compuestos no volátiles, estables y efectivos en un amplio rango de pH, compatibles con los materiales y/o formulaciones en combinación, efectivos a concentraciones bajas, no presentan fotoreactividad, presentan un amplio espectro antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras y mohos (“Final Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, and Butylparaben,” 1984).

A pesar de su extensivo uso, el mecanismo de acción que da el efecto antimicrobiano de los parabenos no ha sido definido (Bredin et al., 2005; Fujita et al., 2007; Nguyen et al., 2005). Diversos autores han propuesto que previenen el crecimiento de microorganismos de diversas maneras, en particular: impiden el transporte de membrana (Freese et al., 1973), o inhiben la síntesis de ADN, ARN y



otras proteínas en bacterias (Nes y Eklund, 1983) o inhiben el sistema de fosfotransferasas que participa en la glicólisis bacteriana (Ma y Marquis, 1996). Los parabenos no inducen resistencia heredable a su efecto en microorganismos, una posible interpretación de este dato es que estos compuestos interfieren con una amplia variedad de blancos intracelulares (Nes y Eklund, 1983).

Los parabenos fueron considerados inocuos durante un largo tiempo, aunque en los últimos 20 años se produjo un gran debate sobre su seguridad (Boberg et al., 2010). La preocupación principal se debe a que algunos parabenos son capaces de ejercer cambios endócrinos cuando los niveles de exposición son altos, los cambios incluyen alteraciones de la actividad hormonal, así como de su síntesis, metabolismo y transporte (Błędzka et al., 2014). En ese sentido, se sabe que algunos parabenos exhiben actividad estrogénica débil (para mayor detalle, véase Sección 1.2.2.1).

Adicionalmente, Nakagawa describió un efecto citotóxico de los parabenos en hepatocitos. La exposición de las células aisladas a concentraciones altas de parabenos (0.5 a 2.0 mM) ocasiona una disminución en la viabilidad celular concentración-dependiente. También, disminuyen los niveles de ATP intracelular y los reservorios de nucleótidos de adenina. En particular, la aplicación de PPB por 3 horas, induce una muerte celular del 50 %, concentración-dependiente (0.5, 1.0 y 2.0 mM); este compuesto también ocasiona una disminución del metabolismo mitocondrial a una concentración de 0.5 mM (Nakagawa y Moldéus, 1998).

Existen evidencias de que algunos parabenos presentan efectos moduladores en canales iónicos dependientes de voltaje y dependientes de ligando. En un estudio, se probaron los efectos del metilparabeno y el butilparabeno (ambos a 300  $\mu$ M) en los canales  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{K}^{+}$ , así como en canales dependientes de ligando de células PC12 de rata (consideradas como precursores neuronales). Los resultados indicaron que ambos parabenos son capaces de inhibir las corrientes mediadas por el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  y de facilitar la inactivación del mismo. Además, ambos compuestos suprimen la corriente de  $\text{K}^{+}$ , metilparabeno la inhibió en un 30 % y el butilparabeno la corriente hasta un 80 %. Por otro lado, se analizó el efecto

en canales dependientes de ligando como los activados por acetilcolina (ACh). Este estudio concluye que el metilparabeno y el butilparabeno inhiben la corriente generada por ACh (100  $\mu$ M), siendo totalmente suprimida por el butilparabeno a una concentración de 300  $\mu$ M (Inoue et al., 1994).

El metilparabeno (1 mM) también es capaz de activar el canal TRPA1 expresados heterológicamente en células HEK293, ya que incrementa la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  medida por la emisión de fluorescencia. Además, fijando estas células a -60 mV y aplicando distintas concentraciones de metilparabeno, se observa que produce corrientes entrantes con un valor de  $CE_{50}$  de 4.4 mM. Por otro lado, con la intención de verificar el efecto del metilparabeno para activar el canal TRPA1 nativo, utilizaron neuronas aisladas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) de ratón, las cuales expresan el canal nativamente. La aplicación de metilparabeno, a una concentración de 5 mM, también indujo corrientes entrantes por la activación del canal TRPA1 (Fujita et al., 2007).

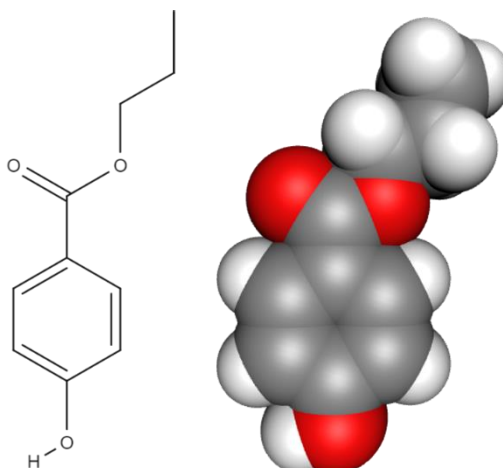
También se ha descrito que el etilparabeno inhibe corrientes de  $Na^+$  en la línea celular GH<sub>3</sub> (derivada de la pituitaria de ratas Wistar). En este estudio se registraron las corrientes de  $Na^+$  en condiciones control y en presencia de etilparabeno (1 mM), los resultados indicaron que el etilparabeno reduce la amplitud de la corriente de  $Na^+$  en un 50 % con respecto al control a los 4 min de exposición al compuesto. Además, los autores reportaron que no presenta un efecto uso-dependiente, al igual que la benzocaína (un anestésico local, cuyo mecanismo de acción es el bloqueo de canales de  $Na^+$ ) (Quan et al., 1996).

## **1.2. Propilparabeno**

### **1.2.1. Características**

El propilparabeno (PPB) es un éster de ácido *p*-hidroxibenzoico (Figura 1). El peso molecular de la molécula es 180.20 g/mol, la fórmula molecular es  $C_{10}H_{12}O_3$  y

su fórmula estructural es  $C_6H_4(OH)(COOC_3H_7)$  (David et al., 2012). Es un compuesto estable y no volátil que en su forma sólida se presenta como cristales sin color o como polvo blanco prácticamente sin olor ni sabor. Es una molécula estable en el aire y resistente a la hidrólisis en agua caliente o fría (Soni et al., 2001).



**Figura 1. Estructura molecular del propilparabeno (PPB).** El PPB pertenece a la familia de los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico. Se representa la estructura química en la fórmula esquelética (panel izquierdo) y la representación 3D de “espacio lleno” de la molécula.

El PPB se presenta en la naturaleza en la cáscara del mango (*Mangifera indica*) de la variedad *Nam Dok Mai* (Tailandia). Se encuentra entre otros compuestos antifúngicos de esta fruta, dichos compuestos son capaces de inhibir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*. La presencia de éstos compuestos en la cáscara de la fruta fue verificada mediante cromatografía de gases, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de protón (Chirawut, 2005).

Otra de las fuentes vegetales de PPB es la “mora de pantano” o “camemoro” (*Rubus chamaemorus L.*). Este tipo de mora se distribuye en el hemisferio norte y

presenta alta resistencia al deterioro por microorganismos. Esta capacidad puede deberse a la presencia de PPB (3 – 9 mg/100 g de mora) y ácido *p*-hidroxibenzoico (43 – 65 mg/100 g de mora), verificado mediante cromatografía de gases (Baardseth y Russwurm, 1978). Además, se ha reportado que el hongo *Verticillium albo-atrum* también es capaz de producir PPB, entre otros compuestos (El Aissami et al., 1998). Finalmente, se han descubierto bacterias marinas, del género *Microbulbifer*, que sintetizan 4-hidroxibenzoato, PPB y otros parabenos capaces de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos, etc. (Peng et al., 2006).

El uso extensivo del PPB, desde hace más de 70 años, ha producido múltiples estudios respecto a su perfil farmacológico (Aalto et al., 1953). Los estudios indican que el PPB es absorbido por la vía gastrointestinal y cutánea, su metabolismo se lleva a cabo por hidrólisis (llevada a cabo principalmente por esterasas), convirtiéndolo en ácido *p*-hidroxibenzoico como metabolito principal en hígado y riñones; no se acumula en el organismo (ni sus metabolitos) cuando se administra crónicamente y posteriormente es excretado por orina (Boberg et al., 2010; Soni et al., 2001). Su uso extensivo ha producido distintas nominaciones que identifican al compuesto, en la Tabla 2 se presenta una recopilación de las distintas denominaciones para el PPB.

La administración de PPB (1 mg/kg) en perros por vía oral demostró que este compuesto se puede encontrar libre en plasma (205  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) y junto con sus metabolitos (370  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ), medido seis horas después de la administración. En estos animales, el PPB es eliminado totalmente después de 48 horas (Jones et al., 1956). En un estudio preliminar, en ratas Wistar juveniles a las que se administró PPB 10 y 100 mg/kg, se determinó que los valores de vida media fueron de 47 y 58 min, respectivamente; de la misma manera, la eliminación fue de 4.20 y 6.68 (l/h)/kg, respectivamente (Gazin et al., 2013). Aunque hasta la fecha, no existen reportes del metabolismo del PPB en humanos adultos (SCCS, 2013).

**Tabla 1.**

Sinónimos, traducciones, nombres alternativos, nombres comerciales (™) y códigos en bases de datos para el Propilparabeno (PPB).

Términos en orden alfanumérico	
• 02642 ( <i>The Personal Care Products Council</i> [CTFA])	• Benzoic acid • Paraben ™ • Propyl chemosept ™
• 061203 ( <i>EPA Pesticide Chemical Code</i> )	• Betacide P ™ • Parahidroxibenzoato de propilo • Propyl chemsept ™
• 202-307-7 ( <i>European Inventory of Existing Commercial chemical Substances</i> [EINECS])	• Betacine P ™ • Parasept ™ • Propyl ester
• 203 ( <i>Hazardous Substances Data Bank</i> [NLM])	• Bonomold OP ™ • Paseptol ™ • Propyl parasept ™
• 23515 ( <i>National Service Center [NSC] of the National Cancer Institute</i> )	• BRN 1103245 ( <i>Registry of Toxic Effects of Chemical Substances</i> [RTECS]) • <i>p</i> -hydroxy propyl benzoate • Propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate
• 2951 ( <i>Flavoring Substance List</i> [FEMA])	• Chemacide pk ™ • <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid propyl ester • Propyl <i>p</i> -oxybenzoate
• 4-10-00-00374 ( <i>Manual Beilstein de Referencias</i> )	• Chemocide pk ™ • <i>p</i> -Hydroxybenzoic propyl ester • Propylester kyseliny <i>p</i> -hydroxybenzoove (Checo)
• 4-hydroxybenzoic acid	• E-216 • <i>p</i> -Hydroxypropyl benzoate • Propylparasept
• 4-hydroxybenzoic acid propyl ester	• Nipagin P ™ • <i>p</i> -hydroxy-propyl ester • Protaben P ™
• 4-hydroxy-propyl ester	• Nipazol ™ • <i>p</i> -Oxybenzoesaurepropylester (Aleman) • Pulvis conservans ™
• 714 (Número Casewell)	• Nipazol M ™ • Preserval P ™ • Solbrol P ™
• 94-13-3 (Número de registro CAS)	• Nipazol P ™ • Propagin ™ • Tegosept P ™
• A13-01341 ( <i>National Library of Medicine</i> [NLM])	• Nipazol ™ • propyl 4-hydroxybenzoate
• Aseptofom P ™	• <i>N</i> -Propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate • Propyl aseptoform ™
• Bayer D 206	• Número FEMA 2951 • Propyl butex ™

Fuentes: *National Toxicology Program* (NIH, 2015) y David et al., 2012.

El PPB presenta baja toxicidad cuando se administra oralmente en animales experimentales. La DL<sub>50</sub> en ratas es de 8000 mg/kg, en perros es de 4000 mg/kg y en ratones es mayor a 6000 mg/kg (Soni et al., 2001). Estudios de 1956 mostraron que no existe evidencia de que presente potencial carcinogénico ni mutagénico. Es importante mencionar que los síntomas típicos de la administración oral de PPB en ratones, incluyen una rápida aparición de ataxia, parálisis y una depresión profunda parecida a la anestesia (Matthews et al., 1956).

**Tabla 2.**

Dosis tóxicas del PPB reportadas.

<b>Especie</b>	<b>Ruta</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Prueba</b>
Ratón	Oral	> 8000	LD <sub>50</sub>
Ratón	Oral	> 3700	LD <sub>50</sub>
Ratón	Oral	6322	LD <sub>50</sub>
Ratón	Subcutánea	1650	LD <sub>50</sub>
Rata	Oral	8000	LD <sub>50</sub>
Rata	Oral	> 8000	LD <sub>50</sub>
Rata	Intraperitoneal	640	LD <sub>50</sub>
Conejo	Oral	6000	LD <sub>100</sub>
Perro	Oral	4000	LD <sub>100</sub>

LD<sub>50</sub>, dosis letal 50; LD<sub>100</sub>, dosis letal 100.  
Traducido de Soni et al., 2001.

Debido a los efectos desestabilizadores del sistema endócrino de diversos parabenos, incluyendo al PPB (para mayores detalles, véase Sección 1.2.2.1), se ha tenido que revisar extensivamente sus efectos en las últimas 2 décadas. El debate sobre su seguridad, dio como resultado la prohibición del PPB como conservador en productos alimenticios de la Unión Europea (EFSA, 2004).

## **1.2.2. Efectos adicionales del PPB**

### **1.2.2.1. Estrogénico**

Uno de los principales efectos agregados del PPB incluye una baja actividad estrogénica (alrededor de 2500 veces menor que el  $17\beta$ -estradiol), la cual provoca un efecto uterotrófico (Routledge et al., 1998).

Además, en estudios *in vitro* se encontraron efectos anti-androgénicos donde el PPB (10  $\mu$ M) es capaz de reducir la capacidad transduccional de la testosterona en un 33 % (Chen et al., 2007). Otro de los efectos antiandrogénicos del PPB inducidos *in vivo* en ratas macho, es la disminución dosis-dependiente en la reserva de esperma en el epidídimo, así como su producción y eficiencia. De igual manera, los niveles de testosterona disminuyeron en una manera dosis-dependiente. Los autores mencionan que sus resultados son relevantes ya que utilizaron los límites de exposición en la Unión Europea para el tiempo del estudio (Oishi, 2002). Sin embargo, este último efecto es controversial. Por ejemplo, en un estudio posterior en ratas macho, a las que se les administró PPB por vía oral por 8 semanas, no se encontraron evidencias de un efecto del PPB en el peso de los órganos reproductivos, parámetros espermáticos epididimales, niveles hormonales ni la histopatología del sistema reproductor (Gazin et al., 2013).

### **1.2.2.2. Relación con el cáncer**

El grupo de Darbre, encontró PPB en muestras de tejido de pacientes con cáncer de mama. La concentración media de parabenos encontrada en estos tejidos fue de  $20.6 \pm 4.2 \text{ ng g}^{-1}$ . Al analizar cada parabeno individualmente, se encontró que el más concentrado es el metilparabeno ( $12.8 \pm 2.2 \text{ ng g}^{-1}$ ), representando el 62 % del total de parabenos en el tejido (Darbre et al., 2004). El mismo grupo, en un estudio posterior, analizó el tejido obtenido de 40 mastectomías. En el caso de este

estudio, se encontraron distintas concentraciones de parabenos en 7 muestras de mujeres que reportaron no usar ningún tipo de desodorantes (Barr et al., 2012). Esta evidencia debe de tomarse con precaución ya que la presencia de parabenos en tejidos humanos no debe de ser anormal, ya que existe exposición a estos compuestos en el medio ambiente (Yamamoto et al., 2011), en diversos productos cosméticos y del hogar (Eriksson et al., 2008), y como conservador en alimentos (Olmo et al., 2015).

### **1.2.2.3. PPB y modulación de canales iónicos**

Existen pocos reportes de los efectos del PPB en canales iónicos. Por ejemplo, el PPB induce una fuga de  $K^+$  en bacterias *Escherichia coli* dada por la porina OmpF (una proteína que presenta poro y es no específica) (Bredin et al., 2005). Éste último efecto pudiera estar mediado y/o aumentado por el incremento en la activación del canal mecanosensible de gran conductancia bacteriano (MscL). Para comprobar esta propuesta, se estudió el efecto de PPB (1 mM) en esferoplastos de *Escherichia Coli*, los resultados indicaron que es capaz de incrementar significativamente la probabilidad de apertura del canal MscL individual (Nguyen et al., 2005).

Por otro lado, Fujita y colaboradores (2007) estudiaron específicamente el efecto del metilparabeno en canales TRPA1. Adicionalmente, probaron otros parabenos y verificaron que el PPB (y los otros parabenos) aumentaron significativamente la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  en células HEK293 que expresan heterológicamente al canal TRPA1. Los autores mencionan que probablemente el benzoato, una característica estructural común a los parabenos, pueda estar involucrada en la actividad de los parabenos en el canal TRPA1 (Fujita et al., 2007).

Debido a que los canales iónicos expresados en neuronas generan y modulan la señalización eléctrica que controla la contracción muscular y la



comunicación neuronal (Catterall et al., 2007), y algunos parabenos tienen efecto en canales, estos compuestos podrían modificar la señalización nerviosa. En ese orden de ideas, en el único estudio donde se analizaron los efectos de parabenos en Sistema Nervioso (SN), Kitamura estudió los efectos anestésicos de la perfusión de anestésicos locales y algunos de los preservativos utilizados en las preparaciones comerciales de dichos anestésicos (etilparabeno, metilparabeno y propilparabeno). Los compuestos se aplicaron solos y en combinación con los anestésicos locales. Para ello realizó la preparación de nervios periféricos y médula espinal aislados de rana toro (*Rana catesbeiana*). El bloqueo total de la conducción del nervio periférico se alcanzó con la concentración de 3 mM de etilparabeno, 5 mM de metilparabeno y 1 mM de PPB. de esta manera, el PPB mostró una concentración efectiva comparable con otro anestésico relevante (en particular, la lidocaína, que fue capaz de bloquear la conducción también a una concentración de 1 mM). El autor también comparó los efectos del PPB en combinación con lidocaína, concluyendo que la combinación (a la misma concentración cada compuesto) presenta un bloqueo de mayor intensidad. Hay que resaltar que, en las gráficas presentadas en este artículo, el PPB tuvo un efecto de disminución de la amplitud del potencial de acción compuesto. Dicho efecto tuvo una magnitud prácticamente igual que el de la lidocaína a las mismas concentraciones (0.2, 0.4 y 0.7 mM) y fue concentración-dependiente (Kitamura, 1979).

Adicionalmente, existe un estudio donde analizaron los efectos electrofisiológicos del PPB en canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Nav) de cardiomiocitos aislados. Para ello, los autores realizaron registros de célula entera en la modalidad de *voltage-clamp* y encontraron que el PPB (10, 30, 100, 250 y 500 μM) bloquea reversiblemente los canales Nav de una manera concentración-dependiente y voltaje-dependiente. Particularmente, la concentración de 500 μM abole totalmente la corriente entrante de Na<sup>+</sup>, con un efecto mínimo a las concentraciones de 10 y 30 μM. Además, el PPB induce un corrimiento de la curva de inactivación en dirección a la hiperpolarización, indicando una facilitación de la inactivación del canal (Ji et al., 2004). En este estudio no se discute el efecto del PPB en la facilitación de la inactivación y no se evaluó el efecto del compuesto en

la recuperación de la inactivación del canal Nav. Tampoco se abordaron las consecuencias que éstos dos efectos pueden tener en los potenciales de acción cardiacos individuales y su frecuencia.

### **1.2.3. Propilparabeno y su efecto cardioprotector, neuroprotector y anticonvulsivo**

Ji et al. (2004), describieron que PPB bloquea corrientes de Na<sup>+</sup> en cardiomiocitos. Estos autores proponen que el pretratamiento con PPB bloquea la entrada de Na<sup>+</sup> a la célula (por consiguiente, una menor acumulación intracelular) y sugieren, que dicho bloqueo es el responsable de un efecto de aumento en la viabilidad de los cardiomiocitos (cardioprotección) expuestos a un modelo de isquemia-reperfusión (Ji et al., 2004).

Otro de los efectos protectores del PPB se evaluó en nuestro laboratorio. En este trabajo se estudió el efecto del PPB en el *Status Epilepticus* (SE) en ratas Wistar. Los resultados indican que el PPB (177 mg/kg i.p.), administrado posterior a la detención del SE con diazepam (DZP), indujo un efecto neuroprotector en el giro dentado, hilus y la región CA3 del hipocampo dorsal de ratas sometidas a SE por el modelo de Litio-Pilocarpina (Santana-Gómez et al., 2017).

El efecto atenuador de las crisis se predijo utilizando Tamizado Virtual. Mediante esta técnica se propuso que el PPB podía tener un efecto anticonvulsivo (Talevi et al., 2007). En consecuencia, se evaluó su efecto protector en el modelo de convulsiones generalizadas por electrochoque máximo (MES, por sus siglas en inglés) en ratones, que es uno de las pruebas utilizadas para el tamizado de fármacos anticonvulsivos (*The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program*) desde 1975 (Stables y Kupferberg, 1997). Los resultados indicaron que su administración (100 y 300 mg/kg) es capaz de evitar el componente de extensión tónica en el 60 % de los ratones (Talevi et al., 2007).

Posteriormente, en experimentos donde se administró PPB (300 mg/kg) treinta minutos antes de la inyección vía i.p. de Lítio-Pilocarpina. Los resultados mostraron que el pretratamiento con el compuesto incrementó significativamente ( $p < 0.001$ ) la latencia de los componentes de la actividad convulsiva del SE, así como el establecimiento y duración total de esta condición (Santana-Gómez, 2012). A continuación, en otra serie de experimentos de nuestro laboratorio se evaluó la administración intraperitoneal de PPB (30 y 60 mg/kg) solo y en combinación con dosis subefectivas de fármacos antiepilépticos (FAE), en particular el DZP, el fenobarbital (PHB) y la fenitoína (PHT). Los resultados indicaron que el PPB aumentó significativamente la latencia de aparición de los distintos componentes convulsivos en el modelo de pentilinetetrazol. Dicho efecto fue mayor cuando se combinó con los fármacos que incrementan la neurotransmisión GABAérgica (DZP y PHB). Por el contrario, el PPB no indujo efectos cuando se combinó con PHT (Enrique et al., en proceso), un fármaco antiepiléptico que bloquea canales Nav (McLean y Macdonald, 1983). Finalmente, en otros resultados del laboratorio, donde se administró DZP y PPB durante el SE, se observó una disminución en las oscilaciones de alta frecuencia en el hipocampo, cambio que estuvo asociado a una disminución significativa en los niveles extracelulares de glutamato y neuroprotección (Santana-Gómez et al., 2017).

#### **1.2.4. Epilepsia y fármacos antiepilépticos**

La epilepsia es un trastorno neurológico que afecta del 1 – 2 % de la población mundial (Browne y Holmes, 2001). Un 20 – 40 % de estos pacientes desarrollan resistencia al tratamiento farmacológico (French, 2007), es por ello que en los últimos años se han desarrollado alrededor de 20 nuevos FAEs con la finalidad de tratar a los pacientes resistentes (Brodie y Sills, 2011). En la actualidad existen diversas herramientas para hacer más eficiente, bajar costos y disminuir el tiempo que lleva el desarrollo y comercialización de fármacos (Lavecchia y Di

Giovanni, 2013). Sin embargo, es necesario evaluar los fármacos con potencial en diversos modelos (*in vivo*, *in vitro*, *in silico*, etc.), antes de ser aplicados en humanos (Köhling y Avoli, 2006). Estos modelos permiten el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico, tratamiento y prevención de la epilepsia y los fenómenos relacionados al trastorno (Engel y Schwartzkroin, 2006). En particular, los modelos *in vitro* permiten el tamizado de fármacos y la posible evaluación de su mecanismo de acción a un costo relativamente bajo, dichos modelos pueden servir para comprobar el efecto de los fármacos en distintas estructuras cerebrales relevantes (Köhling et al., 2006). En ese sentido, se sabe que la formación hipocampal juega un papel importante en las crisis parciales complejas de la Epilepsia del Lóbulo Temporal (Quesney, 1986) y que, por su organización estructural y conectividad, puede favorecer la generación y propagación de la actividad epileptiforme (Rutecki et al., 1989). Además, esta estructura está implicada en el desarrollo, mantenimiento y patología de la epilepsia (Avoli et al., 2002). En el caso de los modelos *in vitro*, una variante consiste en emplear rebanadas hipocampales, la cual ofrece la posibilidad de estudiar los mecanismos de generación, propagación y terminación de la actividad epileptiforme. Este modelo, aunque carece de los componentes conductuales, se basa en fenómenos equivalentes a las crisis convulsivas observadas *in vivo*, como los cambios en la actividad eléctrica de poblaciones neuronales y de neuronas individuales (Heinemann et al., 2006). Además, existen métodos que se pueden emplear para la inducción de actividad epileptiforme, por ejemplo, la estimulación eléctrica, la modificación de concentraciones iónicas, aplicación de agentes convulsivos, etc. (ver Sección 6.1, para mayor detalle).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El PPB es un compuesto aprobado y ampliamente utilizado en diversos productos de consumo humano, en consecuencia, la exposición al compuesto puede ser alta y por tiempos prolongados. Además, se ha demostrado que el PPB ejerce un efecto atenuador de las crisis en modelos *in vivo*, tiene efecto neuroprotector y se ha propuesto que bloquea canales Nav en cardiomiocitos. Sin embargo, no se conoce el efecto directo del PPB en el sistema nervioso central (SNC), particularmente, en la actividad epileptiforme inducida en neuronas piramidales del hipocampo *in vitro*, su excitabilidad y la posible modulación de canales dependientes de voltaje.

## **3. HIPÓTESIS**

El PPB suprime la actividad epileptiforme inducida por 4-Aminopiridina (4-AP) en neuronas piramidales de CA1 del hipocampo *in vitro*, disminuyendo la excitabilidad neuronal a través de la modulación de canales iónicos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Determinar el efecto del PPB en la actividad epileptiforme inducida por 4-AP, la excitabilidad neuronal, así como la posible modulación de canales iónicos en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de la rata.

## 4.2. Objetivos particulares

Determinar el efecto del PPB en los siguientes parámetros evaluados *in vitro* en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de la rata:

1. La actividad epileptiforme inducida con el modelo de 4-AP (100  $\mu\text{M}$ ) y libre de  $\text{Mg}^{2+}$
2. El Disparo Repetitivo Sostenido, la dinámica del potencial de acción y las propiedades pasivas de membrana
3. Las corrientes de  $\text{Na}^+$

## 5. METODOLOGÍA GENERAL

### 5.1. Procedimiento experimental

Para este estudio se emplearon ratas macho de la cepa Wistar juveniles de 21 y 28 días de edad (90 – 140 g). Los animales se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) bajo un ciclo de luz oscuridad 12/12, con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a la norma “NOM-062-ZOO-1999” y fueron aprobados por el Comité de Ética Cinvestav-IPN. Las ratas fueron anestesiadas profundamente con 50 mg/kg i.p. de pentobarbital i.p. Posteriormente se decapitaron y el cerebro fue removido para colocarlo en una solución de sacarosa que contenía (en mM) lo siguiente: Sacarosa, 210; KCl, 2.8;  $\text{MgSO}_4$ , 2;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.25;  $\text{NaHCO}_3$ , 25;  $\text{MgCl}_2$ , 1;  $\text{CaCl}_2$ , 1 y D-(+)-Glucosa, 10. Se realizaron cortes transversos de hipocampo de 385  $\mu\text{m}$  de espesor, mediante un vibratomo (Leica, VT1000 S, Nussloch, Alemania). Las rebanadas obtenidas fueron incubadas a 30 °C (30 min) y después, a temperatura ambiente (1 h) en una solución de incubación que contenía (en mM): NaCl, 125; KCl, 2.5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.2;  $\text{NaHCO}_3$ , 25;  $\text{MgCl}_2$ , 4;  $\text{CaCl}_2$ , 1 y D-(+)-Glucosa, 10. Para su registro, las rebanadas fueron transferidas a una cámara de inmersión

colocada en un microscopio invertido (Nikon ECLIPSE FN1, Nikon Instruments, EEUU), equipado con una videocámara infrarroja con contraste diferencial de interferencia (DIC) y conectada a un monitor (DAGE-MTI, Michigan City, EEUU) y un objetivo 40x de inmersión. Se perfundió líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) a una velocidad de 6 – 10 ml/min (30 °C). La composición del LCRa fue la siguiente (en mM): NaCl, 125; KCl, 3; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.25; NaHCO<sub>3</sub>, 25; MgCl<sub>2</sub>, 2; CaCl<sub>2</sub>, 2 y D-(+)-Glucosa, 10. El LCRa fue gaseado continuamente con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. El intercambio total de la solución en la cámara de registro se llevó a cabo en ≈ 3 min. El PPB fue preparado diariamente y fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y agua desionizada para formar una solución de *stock*. El volumen de DMSO diluido en el LCRa no excedió 0.04 % del volumen total y la aplicación de las soluciones en la cámara de registro se realizó mediante una bomba peristáltica.

## 5.2. Procedimiento electrofisiológico

Se localizó y distinguió a las neuronas piramidales de la región CA1 por su ubicación, tamaño y forma. Se empleó la configuración de *Whole-cell* en las modalidades de *current* y *voltage clamp* para los registros de las neuronas piramidales. Se utilizaron pipetas para *patch* de borosilicacto con una resistencia de 4 - 8 MΩ. Las pipetas fueron llenadas con una solución interna estándar que contenía (en mM): K<sup>+</sup>-gluconato, 135; KCl, 10; NaCl, 5; HEPES, 10; EGTA, 1; Mg<sup>2+</sup>-ATP, 2; Na<sup>+</sup>-GTP, 0.4 y fosfocreatina, 10; con un pH 7.2 - 7.3 ajustado con KOH.

El potencial de membrana ( $V_m$ ) se fijó a -65 mV inyectando corriente según fuera necesario. La resistencia de acceso se monitoreó en cada experimento y se rechazaron los datos de los registros en los que la resistencia cambió en >30% al final del experimento. Todos los experimentos en la modalidad de *current-clamp* se realizaron a una temperatura de 30 – 33 °C y los registros de las corrientes de Na<sup>+</sup> (*voltage-clamp*) se realizaron a temperatura ambiente (22 - 26 °C).

Se utilizó el software pClamp 10.6 (Axon Instruments Inc. Foster City, CA, EEUU) para la generación de protocolos de estimulación, la presentación de los registros, adquisición, almacenamiento y análisis *off-line*.

### **5.3. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con SigmaPlot versión 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose California EEUU) y Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego California EEUU). Dichos análisis incluyeron la t de Student para comparaciones entre dos grupos y ANOVA seguida de Dunn o Kruskal-Wallis (según corresponde) como post hoc. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$ . Todos los valores son expresados como el promedio  $\pm$  EE.



## 6. EXPERIMENTO 1. Efecto del PPB en la actividad epileptiforme inducida por 4-Aminopiridina

### 6.1. Introducción

En 1957 Li y McIlwain describieron por primera vez un método mediante el cual las rebanadas de tejido cerebral pueden mantenerse en condiciones metabólicas y eléctricas estables por periodos suficientes para el registro de su actividad eléctrica (Li y McIlwain, 1957). Estas preparaciones y sus variantes posteriores (Yamamoto y McIlwain, 1966) permiten aproximaciones rápidas, flexibles y accesibles para abordar el estudio de la epilepsia, incluyendo la ictiogénesis, epileptogénesis y farmacorresistencia (Heinemann y Staley, 2014). Los modelos *in vitro* permiten el control de ciertas condiciones experimentales como: temperatura, las concentraciones iónicas extracelulares, aplicación de fármacos, entre otros (Heinemann et al., 2006).

Una de las primeras descripciones de la actividad epileptiforme registrada *in vitro* la realizaron Schwartzkroin y Prince, en la cual aplicaron penicilina al medio que baña a las rebanadas hipocampales y registraron eventos eléctricos similares a los que se presentan durante la aplicación de penicilina *in vivo*. Dichos eventos se describieron primero con potenciales de campo que correspondieron a ráfagas de potenciales de acción en neuronas de la región CA1 del hipocampo de cobayos (Schwartzkroin y Prince, 1977). Experimentos como este demostraron que la actividad epileptiforme registrada *in vitro* es similar y se correlaciona con la actividad electroencefalográfica (EEG) que se presenta en pacientes epilépticos durante una crisis (Avoli et al., 2016; Heinemann y Staley, 2014). La actividad epileptiforme equivalente a la registrada *in vivo* cumple con ciertas características. En el caso de registros de células individuales pueden presentarse PAs individuales con una duración mayor a 100 ms y/o presentarse en ráfagas (Bernard, 2006). Cuando las ráfagas de PAs son rápidas (200 – 500 Hz) y se encuentran superimpuestas a una

despolarización sostenida, seguida de una hiperpolarización lenta, el fenómeno es llamado despolarización paroxística (PDS, en inglés) (Matsumoto y Marsan, 1964).

Para la inducción de actividad epileptiforme en rebanadas de hipocampo (y otros modelos) se han utilizado diversas metodologías, como puede ser la estimulación eléctrica, el bloqueo GABAérgico, bloqueo de canales de  $K^+$ , la modificación de las concentraciones iónicas del LCRa. Estos modelos tienen en común que inducen hiperexcitabilidad neuronal en el hipocampo, sin embargo, cada uno lo hace por diferentes mecanismos (Tabla 3).

La actividad epileptiforme es producida por un aumento en la excitabilidad neuronal, lo cual se traduce en un aumento en la actividad sináptica espontánea. Particularmente, la adición de 4-AP al LCRa además de inducir la actividad epileptiforme característica de este modelo, induce una facilitación de los potenciales sinápticos (Buckle y Haas, 1982; Perreault y Avoli, 1991). Los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP, por sus siglas en inglés) son cambios en voltaje del potencial de membrana de una neurona postsináptica y son producidos por la entrada de iones, cargados positivamente, a la célula. Esta despolarización aumenta la probabilidad de disparo de las neuronas ya que lleva el potencial de membrana más cerca del umbral de disparo (Stolerman, 2015).

**Tabla 3.**Modelos de inducción de actividad epileptiforme *in vitro*.

<b>Modelo</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Referencias</b>
Estimulación eléctrica	Estimulación 60 Hz por 2 s en <i>stratum radiatum</i> de la región CA1	Bernard, 2006; Rafiq et al., 1993
Bloqueo GABAérgico	Aplicación de antagonistas GABAérgicos, produce un estado hiperexcitable	Huberfeld et al., 2007; Hwa y Avoli, 1991; Cohen et al., 2002
Concentraciones iónicas modificadas	Modificando la concentración de $Mg^{2+}$ , el receptor NMDA responde directamente a la acción del glutamato	Mody y Heinemann, 1987; Tancredi et al., 1990
Bloqueo de canales de $K^+$	Perfusión de 4-AP y TEA. Despolarización, provocando que el PMR se encuentre más cercano al umbral de disparo	Galvan et al., 1982; Heinemann y Staley, 2014; Avoli y Jefferys, 2016

## 6.2. Justificación del experimento

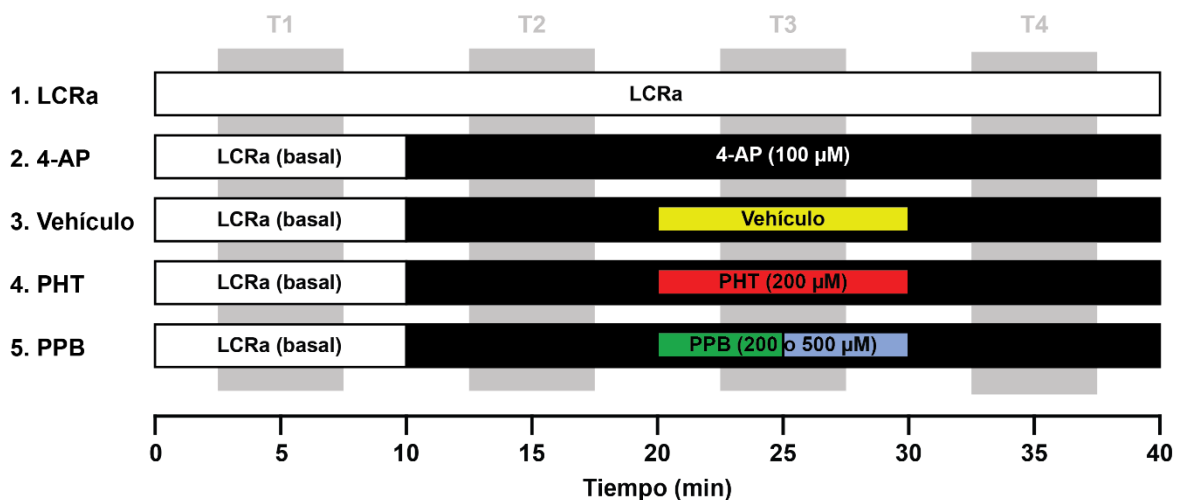
La epilepsia es un trastorno neurológico altamente prevalente, por ello nuevos fármacos siguen en desarrollo. Existen moléculas con potencial efecto anticonvulsivo como lo es el PPB. Con base en los antecedentes presentados, este compuesto tiene efectos neuroprotectores y atenuadores de la actividad convulsiva *in vivo*. Sin embargo, no se ha determinado su efecto directo en neuronas, y si este efecto es capaz de disminuir la actividad epileptiforme *in vitro*. Dicho modelo de inducción de actividad epileptiforme en rebanadas de hipocampo preserva la mayoría de la conectividad intra-hipocampal, que es necesaria para la manifestación de actividad epileptiforme. Además, esta preparación permite medir la actividad espontánea en cuatro tiempos críticos: 1) la actividad previa al tratamiento farmacológico; 2) durante la inducción de actividad epileptiforme; 3) al aplicar el PPB; 4) al retirarlo. Con esto se puede determinar el efecto antiepileptiforme del compuesto.

## 6.3. Metodología particular

Para este objetivo se registró la actividad espontánea de las neuronas piramidales en la modalidad de *current-clamp*, manteniendo a las neuronas durante todo el registro a un potencial de membrana de -65 a -50 mV. La inducción de actividad epileptiforme se realizó añadiendo 4-AP (100  $\mu$ M) al LCRa en ausencia de  $Mg^{2+}$ , sin modificar la concentración de los demás componentes (Siniscalchi et al., 1997; Traub et al., 1996). Este modelo induce actividad epileptiforme recurrente o sostenida que, clínicamente, es similar al SE (Heinemann y Staley, 2014). Además, puede ser utilizado para definir los efectos de fármacos anticonvulsivos en la actividad epileptiforme (Avoli y Jefferys, 2016; Galvan et al., 1982) o probar nuevos fármacos con potencial anticonvulsivo (Garduño et al., 2005). A continuación, se describe detalladamente el procedimiento experimental para este objetivo.

### 6.3.1. Procedimiento experimental

El procedimiento experimental se muestra en la Figura 2. Este incluyó 5 grupos experimentales en los que se realizó: a) registro basal, durante el cual se perfundió LCRa normal (T1); b) aplicación de 4-AP (100  $\mu\text{M}$ ) en LCRa en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (T2); c) aplicación de 4-AP más el vehículo y los distintos fármacos (DMSO 0.04%, PHT, 200  $\mu\text{M}$ ; PPB 200 y 500  $\mu\text{M}$ ) (T3); d) 4-AP sola nuevamente o el lavado de los fármacos (T4). Cada condición experimental duró un mínimo de 10 min, a excepción del grupo LCRa y de 4-AP, a los cuales no se les aplicó ningún fármaco.



**Figura 2. Diseño experimental y análisis de la actividad epileptiforme.**

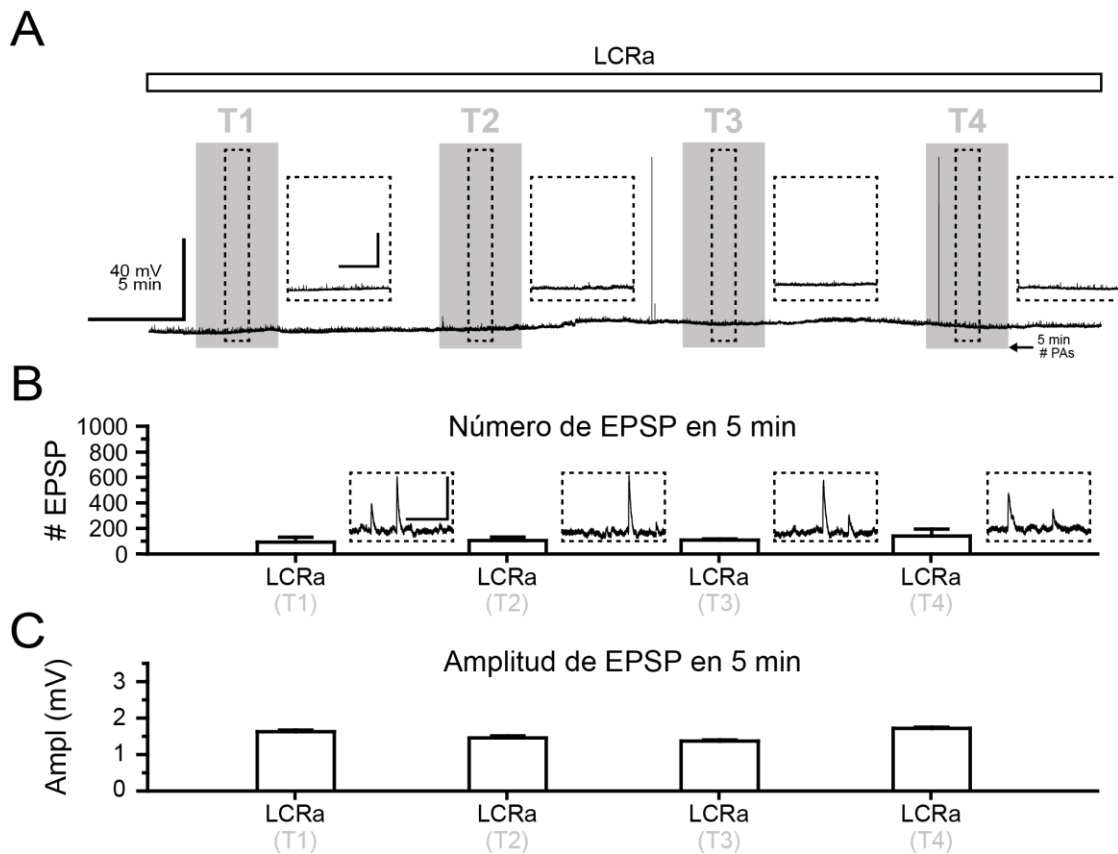
**1)** Grupo LCRa: en el que se registró la actividad de las neuronas piramidales en LCRa normal. **2)** Grupo control 4-AP: en este grupo se añadió 4-AP al baño para la inducción de la actividad epileptiforme (barra negra). **3)** Vehículo: en este grupo se aplicó el vehículo por 10 min (barra amarilla) durante la actividad epileptiforme inducida por 4-AP. **4)** PHT: el procedimiento es el mismo que el vehículo, excepto que se añadió PHT (200  $\mu\text{M}$ ) en lugar del vehículo (barra roja). **5)** PPB: en este grupo se siguió el mismo procedimiento que el anterior con la excepción de que se aplica PPB a 200 o 500  $\mu\text{M}$  en lugar de la PHT (barra verde y azul). Los rectángulos grises en el fondo representan las ventanas de tiempo (5 min) analizadas durante cada condición (T1, T2, T3 y T4).

Se consideró actividad epileptiforme cuando se presentan potenciales de acción (PAs) durante al menos 30 s de manera continua. El análisis de resultados consistió en contabilizar el número de PAs, así como los EPSPs y su amplitud en una ventana temporal de 5 min en cada condición experimental (rectángulo gris en la Figura 2, referido como T1 - T4). Cada PA se definió como una despolarización súbita y subsecuente repolarización con duración menor a 3 ms, que superara los 0 mV. Por otra parte, se contabilizaron los EPSPs cuya amplitud superara 1 mV y no excediera los 10 mV, para ello, fueron filtrados mediante un modelo digital y se distinguieron como eventos individuales a los cumplieran con las siguientes características: deflexión positiva compuesta de una fase ascendente suave que fuera más corta en duración que la fase descendente. La amplitud fue medida a partir de la línea base que precedía a cada evento hasta el pico máximo.

## **6.4. Resultados**

### **6.4.1.1. Grupo de LCRa**

Las neuronas piramidales registradas en LCRa normal por más de 45 min exhibieron PAs aislados, estos estuvieron separados por periodos silentes de más de 20 minutos entre sí. La actividad espontánea no mostró diferencias en la frecuencia de PAs, en el número de EPSPs o su amplitud. Este patrón de actividad se mantuvo estable al comparar las 4 ventanas de análisis, los valores promedio se resumen en las Tablas 4 y 5. En la Figura 3 (Panel A) se muestra el trazo representativo del registro obtenido de una de estas neuronas.



**Figura 3. Actividad espontánea durante la perfusión de LCRa normal.**

**A)** Trazo representativo de la actividad espontánea de una neurona piramidal de la región CA1 del hipocampo registrada durante la perfusión de LCRa normal. Nótese que sólo se presentaron dos PAs cerca del medio y al final del trazo. El inserto representa la versión expandida del trazo dentro del recuadro en línea punteada. El área resaltada en gris corresponde a la ventana temporal de análisis indicada en la parte superior (T1, T2, etc.).

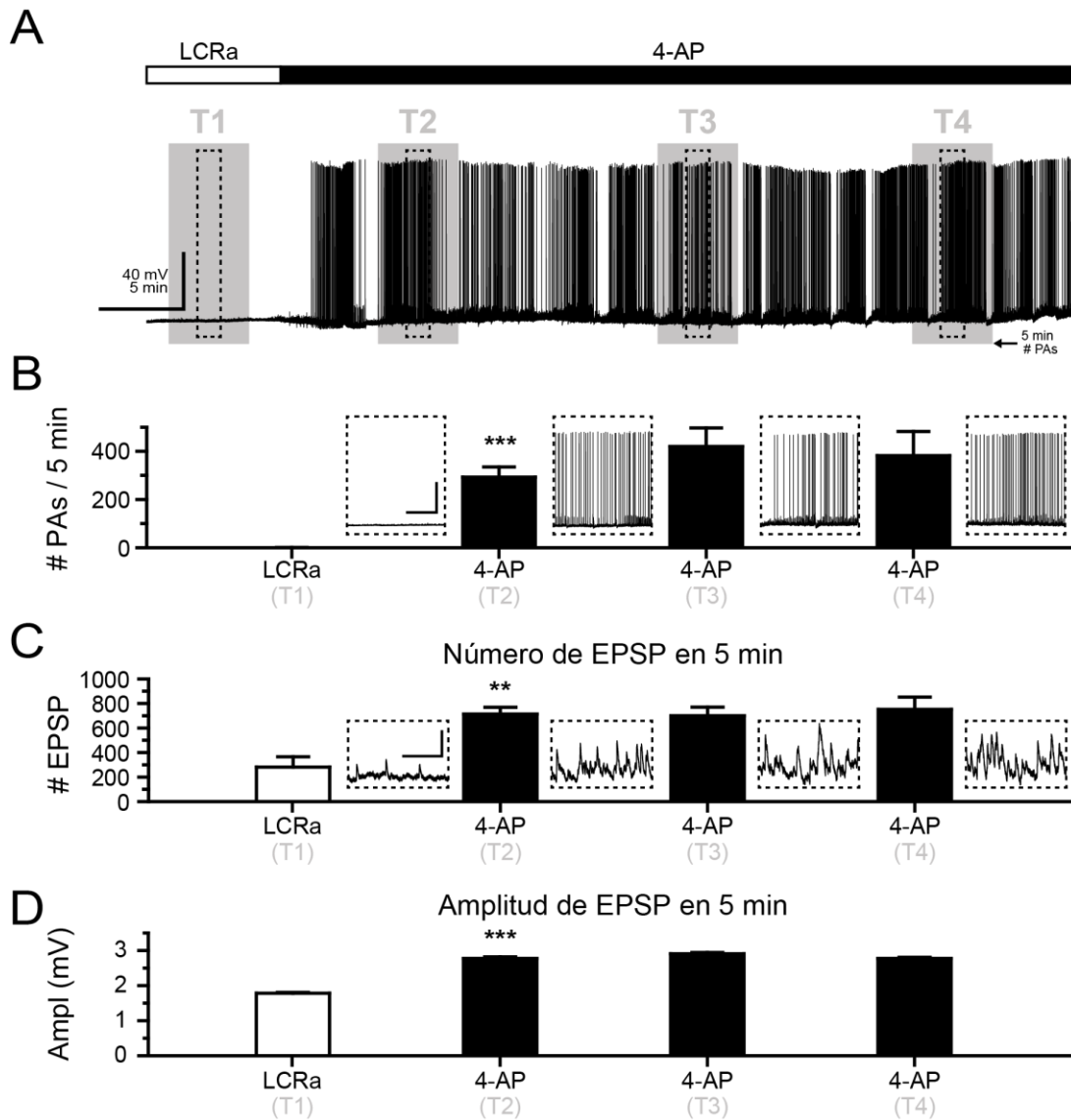
**B)** Gráfica de barras que muestra el promedio del número de EPSPs que se contabilizaron durante cada ventana de análisis. Los insertos muestran los trazos característicos de EPSPs que corresponden a cada ventana.

**C)** Amplitud promedio de los EPSPs contabilizados.  $n = 3$ . Barras de calibración: A, 30 s y 40 mV; B, 0.5 s y 2 mV.

#### **6.4.1.2. Actividad epileptiforme inducida por 4-AP**

La aplicación de 4-AP indujo actividad epileptiforme con una latencia de  $6.2 \pm 0.9$  min, a partir del inicio de la perfusión del fármaco. Esta actividad se caracterizó por PAs consecutivos a una frecuencia de  $1.05 \pm 0.1$  Hz. En algunos casos se observaron periodos silentes, que después de uno o dos minutos finalizaron con la reaparición de PAs consecutivos. Estos patrones de actividad epileptiforme están de acuerdo con lo reportado previamente para neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (Fernández et al., 2010), CA3 y corteza entorrinal de rata (Avoli et al., 2002; Garduño et al., 2005; Tancredi et al., 1990). En la Figura 4 (Panel A) se muestra un trazo representativo del registro de una neurona a la que se le indujo actividad epileptiforme. El promedio de los PAs contabilizados en cada ventana temporal se resume en la Tabla 4. Además, la aplicación de 4-AP provocó un aumento en el número (253%;  $p < 0.01$ ) y amplitud (155%;  $p < 0.001$ ) de los EPSPs en comparación con la actividad espontánea en LCRa normal (Figura 4, Paneles C y D; Tabla 5).





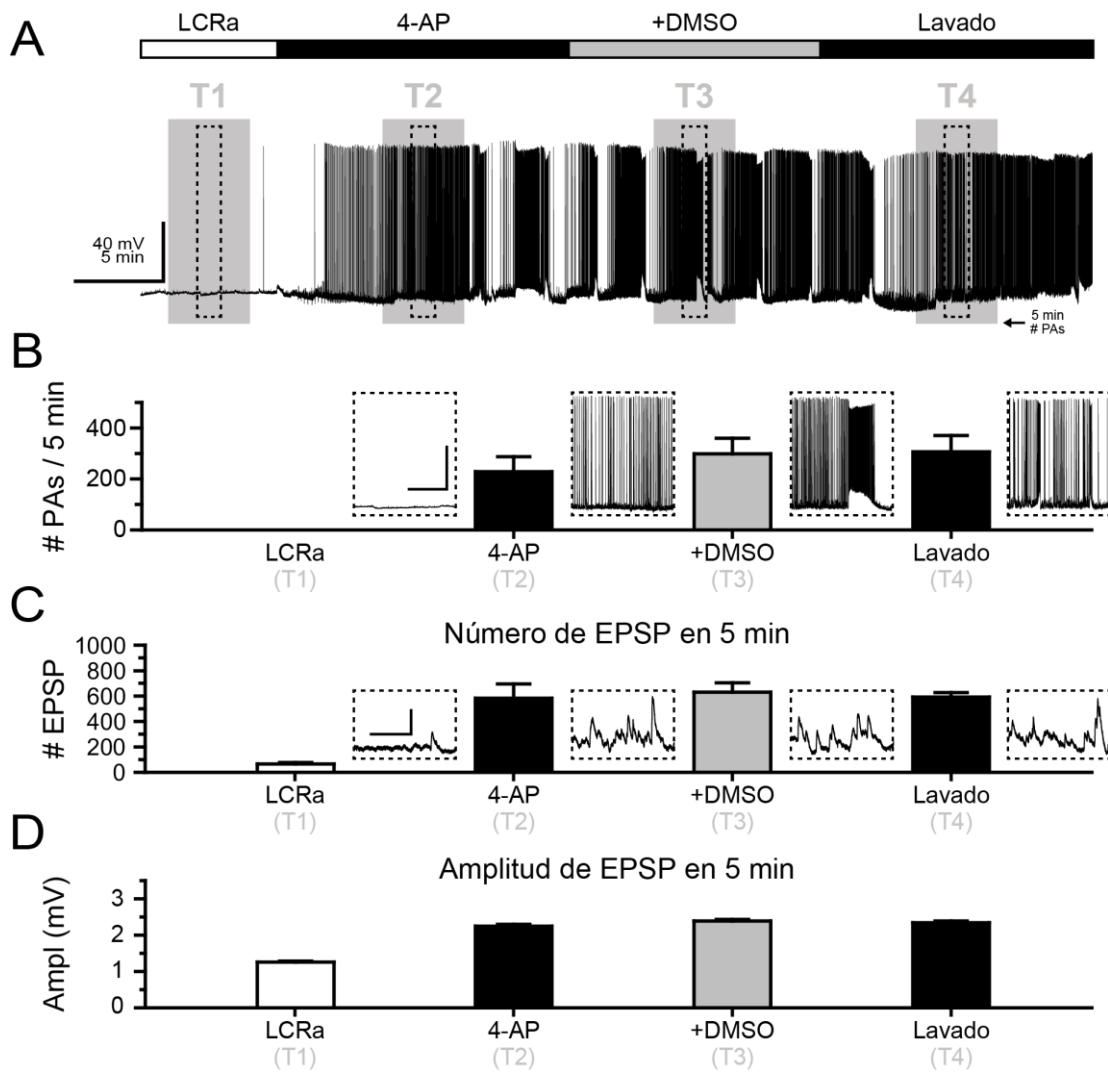
**Figura 4. Registro de la actividad espontánea durante la inducción de actividad epileptiforme por la aplicación de 4-AP. A)** Trazo representativo de una neurona piramidal a la que se le aplicó 4-AP (barra horizontal negra). **B-D)** Gráficas de barras que muestran el promedio del número de PAs (**B**), número (**C**) y amplitud (**D**) de EPSPs durante las 4 ventanas temporales analizadas. Los insertos y anotaciones de acuerdo a la Figura 3. Barras de calibración: **B**, 30 s y 40 mV; **C**, 0.5 s y 2 mV. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  comparado contra LCRa,  $n = 6$ .

### **6.4.1.3. Efecto de la aplicación del vehículo en la actividad epileptiforme**

La aplicación de DMSO no modificó la frecuencia de PAs (13%,  $p > 0.5$ ), ni en el número o amplitud de EPSPs (8% y 6%, respectivamente) con respecto a la 4-AP sola ( $p > 0.5$ ), como se muestra en la Figura 5 (Paneles A y B). Con este resultado descartamos que el vehículo empleado en este trabajo tuviera un efecto en la actividad epileptiforme (Tablas 4 y 5).

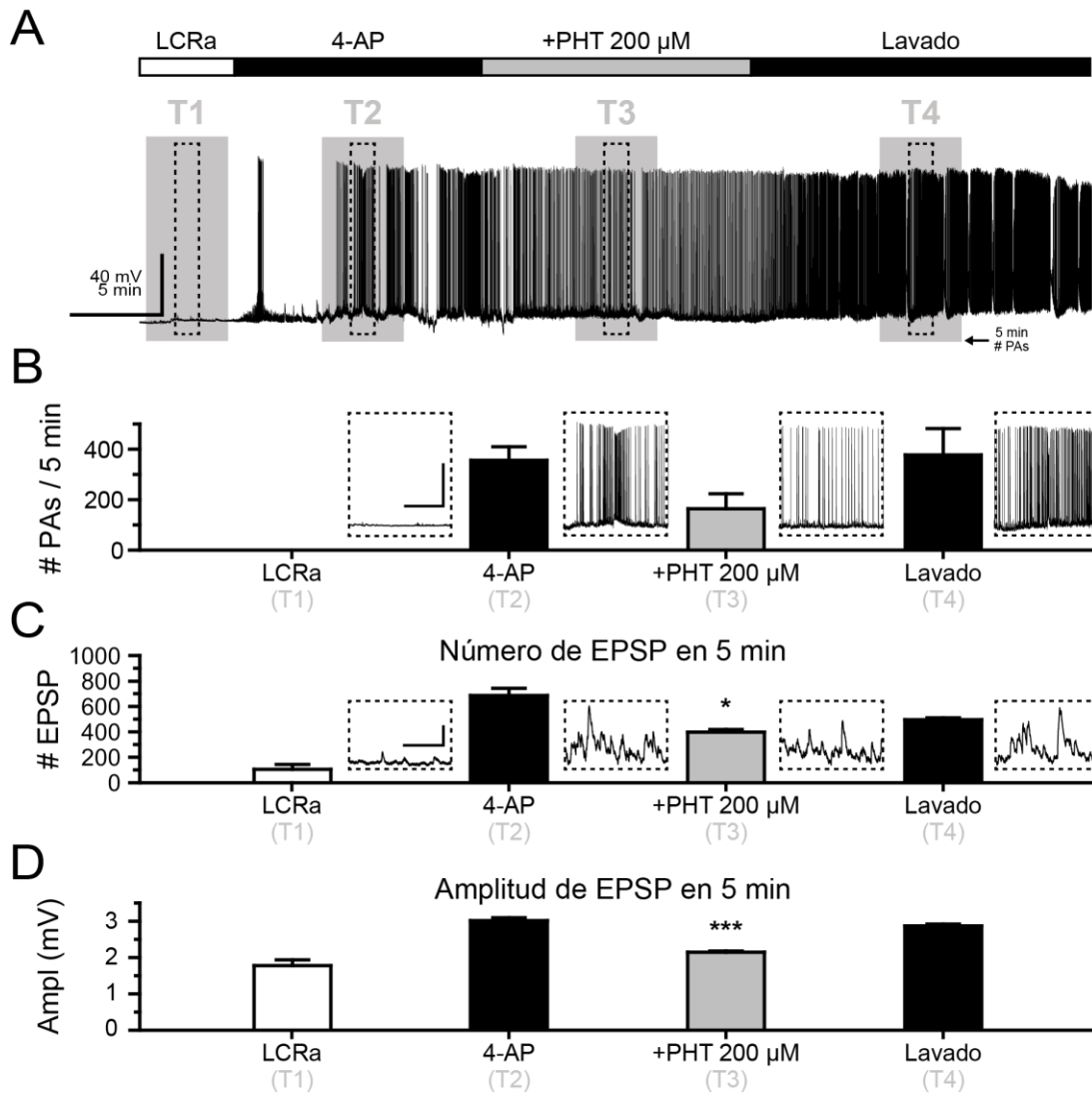
#### **6.4.1.1. Efecto de la fenitoína en la actividad epileptiforme**

La aplicación de PHT (200  $\mu$ M) redujo la frecuencia de PAs en un 54%, sin embargo, la diferencia no fue significativa ( $p > 0.5$ ). En la Figura 6 (Panel A) se muestra un trazo representativo y en la Tabla 4 el resumen de los valores promedio. Adicionalmente, la aplicación de PHT redujo el número (43%,  $p < 0.05$ ) y la amplitud de los EPSPs (30%,  $p < 0.001$ ), como se observa en la Figura 6 (Paneles C y D). A pesar de la reducción en los tres parámetros, la PHT no suprimió la actividad epileptiforme. Finalmente, al realizar el lavado del fármaco se observó que la frecuencia de PAs, el número y amplitud de EPSPs aumentaron nuevamente. Los valores se resumen en las Tablas 4 y 5.



**Figura 5. Efecto del DMSO (vehículo) en la actividad epileptiforme. A)**

Trazo representativo de una neurona a la que se le aplicó DMSO (barra superior gris). **B-D)** Gráficas de barras que muestran el promedio del número de PAs (**B**), número (**C**) y amplitud (**D**) de EPSPs durante las 4 ventanas analizadas. Los insertos y anotaciones de acuerdo a la Figura 3.  $n = 3$ . Barras de calibración: **B**, 30 s y 40 mV; **C**, 0.5 s y 2 mV.



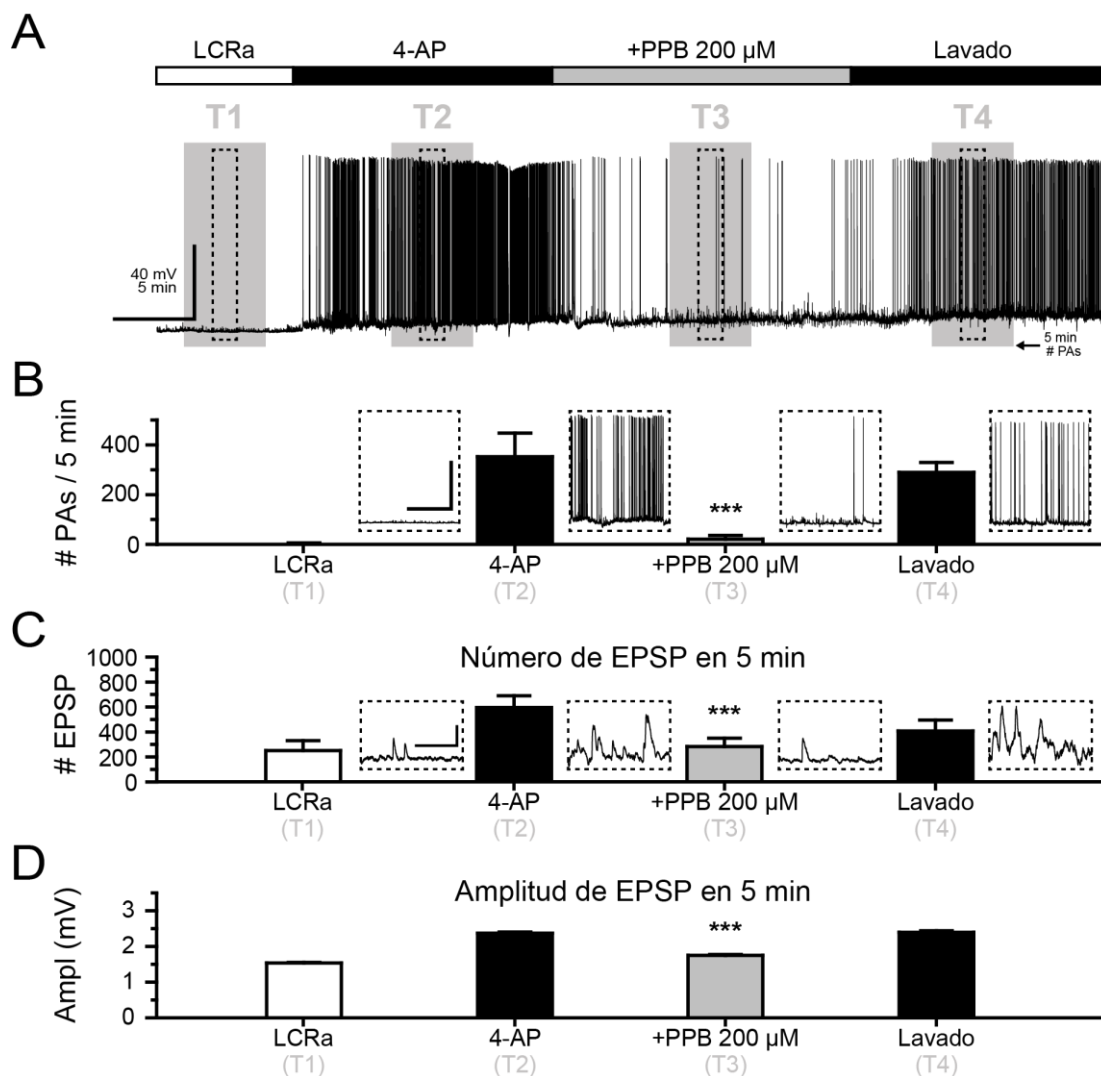
**Figura 6. Efecto de la PHT en el patrón de actividad epileptiforme. A)**

Trazo representativo de una neurona a la que se le aplicó PHT durante la actividad epileptiforme (barra gris). Nótese el cambio en el patrón de actividad inducido por la aplicación de PHT. **B-D)** Gráficas de barras que muestran el promedio del número de PAs (**B**), número (**C**) y amplitud (**D**) de EPSPs durante las 4 ventanas temporales analizadas. Los insertos y anotaciones de acuerdo a la Figura 3. Barras de calibración: **B**, 30 s y 40 mV; **C**, 0.5 s y 2 mV. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  comparado contra 4-AP,  $n = 3$ .

#### **6.4.1.2. Efecto del PPB en la actividad epileptiforme**

La aplicación PPB (200  $\mu\text{M}$ ) provocó una reducción de un 94% en la frecuencia de PAs en comparación con la 4-AP sola ( $p < 0.001$ ), como se observa en la Figura 7 (Paneles A y B). Además, la aplicación de PPB también redujo el número EPSPs y su amplitud en un 52 % y 26 %, respectivamente ( $p < 0.001$ ). Cabe destacar que al retirar el fármaco (Lavado), la actividad epileptiforme reapareció, situación asociada a un aumento en el número y amplitud de los EPSPs (Tablas 4 y 5).

Al aplicar la mayor concentración de PPB (500  $\mu\text{M}$ ), produjo una reducción gradual de la frecuencia de PAs hasta que, con una latencia de  $7.03 \pm 0.6$  min, suprimió totalmente la actividad epileptiforme en el 75% de las rebanadas ( $p < 0.001$ ), como se observa en la Figura 8 (Panel A). De igual forma, esta concentración de PPB redujo el número y la amplitud de los EPSPs en comparación con la 4-AP sola (en un 76% y 31 %, respectivamente;  $p < 0.001$ ). Estos efectos fueron reversibles cuando se realizó el lavado del fármaco, ya que reapareció la actividad epileptiforme (Figura 8; Tablas 4 y 5).



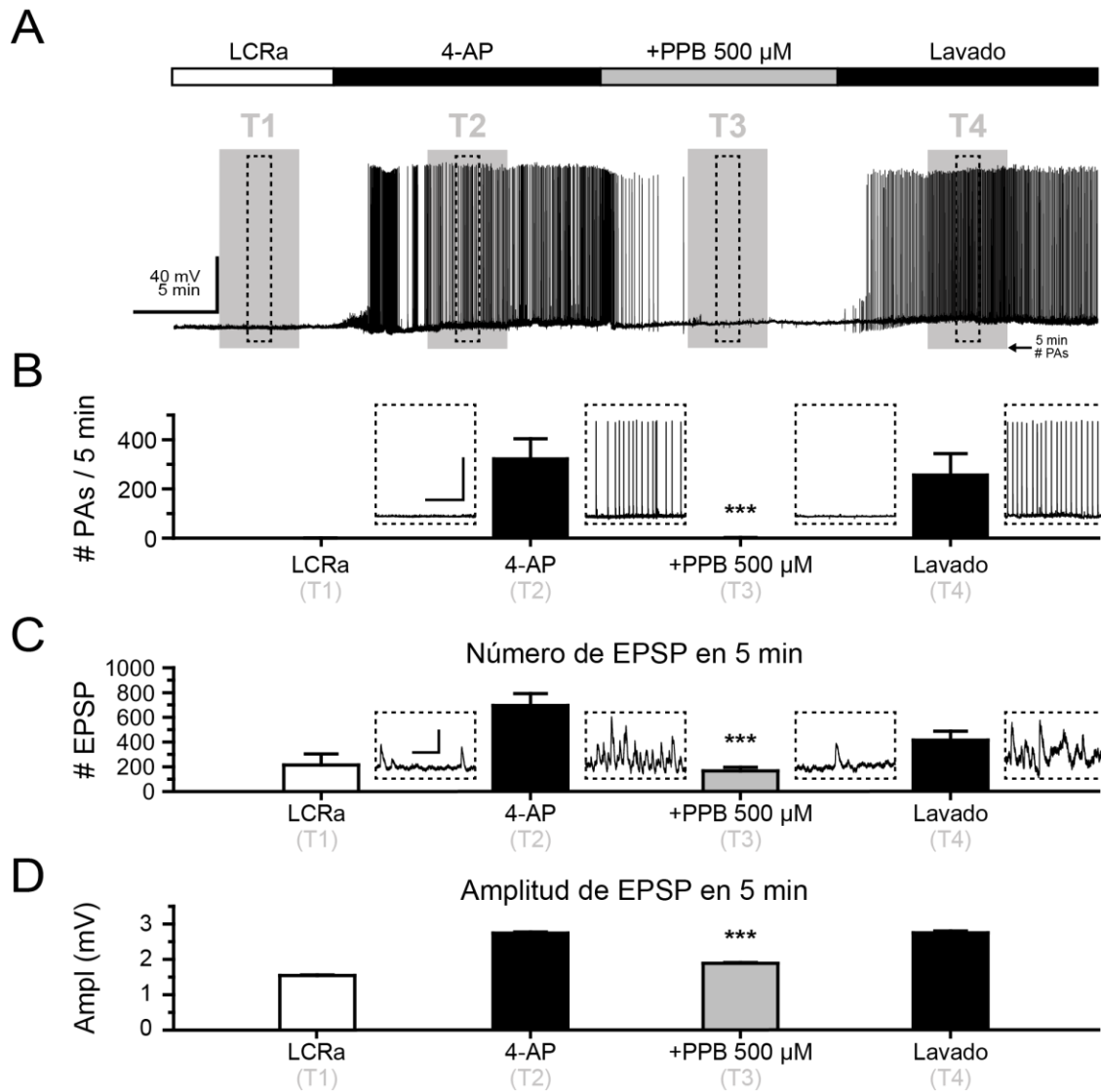
**Figura 7. Efecto del PPB (200  $\mu$ M) en la actividad epileptiforme inducida por 4-AP.** **A)** Trazo representativo de la actividad espontánea de una neurona a la que se le aplicó PPB durante la actividad epileptiforme (barra gris). Nótese el efecto del PPB disminuyendo progresivamente el número de PAs. Además, minutos después de lavar el fármaco, se reestablece la actividad epileptiforme. **B-D)** Gráficas de barras que muestran el promedio del número de PAs (**B**), número (**C**) y amplitud (**D**) de EPSPs durante las 4 ventanas temporales analizadas. Los insertos y anotaciones de acuerdo a la Figura 3. Barras de calibración: **B**, 30 s y 40 mV; **C**, 0.5 s y 2 mV. \*\*\*  $p < 0.001$  comparado contra 4-AP,  $n = 6$ .

**Tabla 4.**

Promedio del número de potenciales de acción contabilizados durante 5 minutos, para cada grupo en cada condición experimental.

Grupo	Condición experimental			
	T1	T2	T3	T4
Basal (n = 3)	LCRa	LCRa	LCRa	LCRa
	0	0.3 ± 0.3	0	0.3 ± 0.3
4-AP (n = 6)	LCRa	4-AP	4-AP	4-AP
	0.5 ± 0.3	292.5 ± 42.3 <sup>###</sup>	419.7 ± 77.1	381.3 ± 100.4
Vehículo (n = 3)	LCRa	4-AP	+Fármaco	Lavado
	0	228 ± 61.3	298.3 ± 61.3	306.7 ± 63.3
PHT (200 µM) (n = 3)	0	356 ± 53.4	164.3 ± 58.9	377 ± 104.8
PPB (200 µM) (n = 6)	3 ± 2.4	352.13 ± 94.9	21 ± 14.9 <sup>***</sup>	289.3 ± 39.6
PPB (500 µM) (n = 8)	0.2 ± 0.2	321.75 ± 81.5	1.5 ± 0.7 <sup>***</sup>	255.9 ± 87.4

LCRa, líquido cefalorraquídeo artificial; 4-AP, 4-aminopiridina; PHT, fenitoína; PPB, propilparabeno. Todos los valores se muestran en promedio ± EE. <sup>###</sup> p < 0.001 comparado con LCRA, <sup>\*\*\*</sup> p < 0.001 comparado con 4-AP.



**Figura 8. Supresión de la actividad epileptiforme por la aplicación de PPB (500  $\mu$ M).** **A**) Trazo representativo de la actividad espontánea durante la aplicación de PPB 500  $\mu$ M (barra gris). Nótese el efecto de supresión de la actividad epileptiforme. **B-D**) Gráficas de barras que muestran el promedio del número de PAs (**B**), número (**C**) y amplitud (**D**) de EPSPs durante las 4 ventanas temporales analizadas. Los insertos y anotaciones de acuerdo a la Figura 3. Barras de calibración: **B**, 30 s y 40 mV; **C**, 0.5 s y 2 mV. \*\*\*  $p < 0.001$  comparado contra 4-AP,  $n = 8$ .



**Tabla 5.**  
Promedio del número de los EPSPs y su amplitud para cada grupo en cada condición experimental.

Grupo	Condición experimental							
	T1		T2		T3		T4	
	No. Eventos	Amplitud (mV)	No. Eventos	Amplitud (mV)	No. Eventos	Amplitud (mV)	No. Eventos	Amplitud (mV)
Basal (n = 3)	LCRA	1.62 ± 0.04	104.66 ± 27.11	1.45 ± 0.05	107.33 ± 9.38	1.37 ± 0.02	140 ± 54.51	1.71 ± 0.03
	LCRA							
4-AP (n = 6)	LCRA	1.78 ± 0.02	713.16 ± 55.09 <sup>#</sup>	2.77 ± 0.04 <sup>###</sup>	699.16 ± 71.36	2.90 ± 0.03	752 ± 100.46	2.77 ± 0.03
	4-AP							
Vehículo (n = 3)	LCRA	1.25 ± 0.02	581.66 ± 112.89	2.24 ± 0.05	629.33 ± 74.78	2.38 ± 0.04	591.66 ± 34.80	2.33 ± 0.04
	4-AP							
PHT (200 μM) (n = 3)	LCRA	1.77 ± 0.15	685.33 ± 56.30	3.01 ± 0.07	397.33 ± 19.93	2.14 ± 0.03	495 ± 14.74	2.86 ± 0.05
	4-AP							
PPB (200 μM) (n = 6)	LCRA	1.54 ± 0.01	597 ± 95.26	2.38 ± 0.03	283.16 ± 67.03 <sup>***</sup>	1.75 ± 0.02 <sup>***</sup>	408.16 ± 88.67	2.40 ± 0.04
	4-AP							
PPB (500 μM) (n = 8)	LCRA	1.54 ± 0.01	694.42 ± 96.41	2.73 ± 0.03	166.42 ± 29.51 <sup>***</sup>	1.88 ± 0.02 <sup>***</sup>	415.14 ± 72.38	2.74 ± 0.05
	4-AP							
	LCRA				+Fármaco		Lavado	

LCRA, líquido cefalorraquídeo artificial; 4-AP, 4-aminopiridina; PHT, fenitoína; PPB, propilparabeno.  
 Todos los valores se muestran en promedio ± EE. <sup>#</sup> p < 0.01, <sup>###</sup> p < 0.001 comparado con LCRA, <sup>\*\*\*</sup> p < 0.001 comparado con 4-AP.

## 6.5. Discusión

La epilepsia es una enfermedad neurológica que se caracteriza por el aumento en la actividad eléctrica neuronal y la sincronización entre poblaciones neuronales de distintas regiones. Esto puede ser resultado de un desequilibrio entre la inhibición y la excitabilidad, provocado por un aumento en la última (McCormick y Contreras, 2001). Una característica en común de los FAEs es que reducen la excitabilidad neuronal mediante diversos mecanismos de acción (Diao et al., 2013; Rogawski y Löscher, 2004). En este trabajo se empleó un modelo *in vitro* utilizado para la evaluación de fármacos antiepilépticos. Este modelo consiste en inducir actividad epileptiforme en rebanadas de hipocampo y evaluar el efecto de un fármaco en dicha actividad (Yonekawa et al., 1995).

La actividad epileptiforme obtenida en este trabajo presentó las características previamente descritas en la literatura como lo son: series de despolarizaciones sucesivas asociadas a múltiples PAs durante la perfusión de 4-AP (Fernández et al., 2010; Garduño et al., 2005), PDS (Matsumoto y Marsan, 1964), un aumento en la actividad sináptica espontánea (Perreault y Avoli, 1991; Zhang et al., 2012). El patrón de actividad fue consistente durante más de 50 min, lo que nos hace descartar que la disminución de la actividad epileptiforme se deba al tiempo de experimentación. Además, descartamos un efecto del DMSO ya que a una concentración  $\leq 0.04\%$ , no modificó el patrón de disparo. Esto debido a que se sabe que el DMSO, a concentraciones mayores, induce una reducción en la excitabilidad neuronal (Tamagnini et al., 2014).

Por otro lado, la aplicación de PHT (200  $\mu\text{M}$ ) disminuyó el número de PAs de manera no significativa. Este resultado es consistente y podría explicar los de estudios donde se registró la actividad de poblaciones neuronales (registros de campo), en los que la PHT (y otros FAEs) es incapaz de suprimir la actividad epileptiforme en la región CA1 del hipocampo (Brückner y Heinemann, 2000). En el mismo sentido, datos obtenidos por registros de campo en corteza entorrinal donde la aplicación de PHT inhibe pero tampoco suprime la actividad epileptiforme

(Brückner et al., 1999), ni en la región CA3 del hipocampo (Diao et al., 2013). Es por ello que consideramos necesario estudiar el efecto del PPB en registros de campo de la región CA1 (y otras), para conocer su efectividad en la supresión de la actividad epileptiforme de poblaciones neuronales.

En cambio, la aplicación de PPB a 200  $\mu$ M disminuyó significativamente el número de PAs y, de hecho, la concentración de 500  $\mu$ M suprimió totalmente la actividad epileptiforme. Este resultado confirma datos previos, donde la administración sistémica de PPB tiene efectos atenuadores de la actividad convulsiva *in vivo* (Santana-Gómez et al., 2017). Con los resultados se concluye que el PPB puede controlar la actividad epileptiforme *in vitro*, revirtiendo la sobreexcitabilidad inducida por la aplicación de 4-AP. Con ello se puede inferir que el PPB puede prevenir la actividad de sincronización con otras neuronas y posteriormente a otras estructuras.

Por otra parte, la disminución en el número y la amplitud de EPSPs durante la actividad epileptiforme debida a la aplicación de PPB sugieren un efecto presináptico, reduciendo la probabilidad de liberación de neurotransmisores en sinapsis excitatorias e inhibitorias (Yonekawa et al., 1995). Lo cual también contribuye a la disminución de la excitabilidad del circuito hipocampal. Esta reducción inducida por el PPB coincide con resultados previos de Santana-Gómez et al. (2017), en los cuales se mostró que la administración sistémica de PPB revierte el incremento en la liberación de glutamato en el hipocampo de ratas durante el SE inducido por litio-pilocarpina.

Los resultados de este experimento confirman los efectos atenuadores de la actividad convulsiva observados *in vivo* (Enrique et al., en proceso; Santana-Gómez, 2012; Santana-Gómez et al., 2017). Aunque, es necesario estudiar el efecto del PPB en otros modelos de actividad epileptiforme *in vitro* para verificar su efectividad, ya que se ha observado un efecto diferencial de distintos FAEs (Klaft et al., 2016; Xie et al., 2013).

Modelos generados *in silico* predicen la actividad anticonvulsiva del PPB, además, dicha actividad se confirmó en varios modelos animales *in vivo* (Enrique et

al., en proceso; Santana-Gómez, 2012; Santana-Gómez et al., 2017). El presente estudio demostró *in vitro* el efecto atenuador de la actividad convulsiva de esta molécula (ejerciendo un efecto aún mayor que el de la PHT). A pesar de esta evidencia, aún no se deduce el mecanismo celular por el cual ejerce el efecto supresor de la actividad epileptiforme. Por ello, en el siguiente experimento, decidimos examinar el efecto del PPB en la excitabilidad neuronal. Esto permitió discernir si la atenuación de la actividad anticonvulsiva se debió a una reducción de la excitabilidad intrínseca de las neuronas (por ejemplo: el umbral y frecuencia de disparo, magnitud de la respuesta a estimulación, potencial de membrana, etc.).

## **7. EXPERIMENTO 2. Efecto del PPB sobre la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1**

### **7.1. Introducción**

Una definición general de excitabilidad intrínseca neuronal útil y representativa para el presente trabajo es la publicada en Nature en su clasificación de temas o *subjects*: “*Intrinsic excitability is the electrical excitability of a particular neuron. It is determined by the number and distribution of ion channels and receptors that contribute to the electrical properties and depolarization potential of the neuron*” (Nature Subjects, 2016). En español: La excitabilidad intrínseca es la excitabilidad eléctrica de una neurona particular. Está determinada por el número y distribución de canales iónicos y receptores a neurotransmisores que contribuyen a las propiedades eléctricas y al potencial de despolarización de la neurona. Por lo tanto, podemos inferir que los estímulos (farmacológicos, sinápticos, eléctricos, genéticos, etc.) que afecten alguno de estos elementos, pueden modular la excitabilidad de las neuronas en forma individual o en población. La manipulación de alguno de estos factores puede modificar los patrones de respuesta neuronales, en forma de PAs. Esta última es una de las formas de comunicación neuronal básica y sobre la cual incide directamente el estado de excitabilidad de una neurona particular.

#### **7.1.1. Propiedades pasivas de la membrana y excitabilidad intrínseca neuronal**

La membrana celular separa fluidos con una composición iónica distinta. La presencia de canales iónicos, bombas, transportadores, etc., en esta membrana, determinan el Potencial de Membrana en Reposo (PMR) y le confieren además una permeabilidad selectiva (Lamas, 2005). Cuando la célula no recibe estimulación, el valor del PMR permanece relativamente constante y se encuentra cercano al

potencial de equilibrio del  $K^+$ , en un rango de -60 a -80 mV (Koester y Siegelbaum, 2014).

Por el contrario, cuando se inyecta un pulso de corriente positiva de intensidad menor a la necesaria para generar un PA (ver adelante, Sección 1.2.1.1.), la membrana neuronal responde con una despolarización subumbral (Koch, 2004). Las características de estas respuestas están definidas por las propiedades pasivas de la membrana celular. Dichas propiedades juegan un papel fundamental en: a) el curso temporal de un potencial sináptico generado por una corriente, b) la posibilidad de que este potencial generado se convierta en una respuesta sub o supraumbral, y c) la velocidad a la que se conduce el PA después de su generación (Kandel y Schwartz, 2013). La membrana celular tiene la propiedad de funcionar como una resistencia (por los canales iónicos embebidos en ella) y como un capacitor (por la doble capa de lípidos). Estas dos propiedades determinan las respuestas en voltaje, particularmente enlenteciéndolas (Purves et al., 2004). Por esta razón, la respuesta de la membrana a un pulso de corriente sigue un curso exponencial; de hecho, es posible medir el tiempo que tarda en llegar a un punto estacionario o el voltaje final. En este caso, la constante de tiempo de la membrana se refiere al tiempo requerido para alcanzar el 63% del voltaje final (Isokawa, 1997).

En respuesta a la inyección de pulsos de corriente (negativa) hiperpolarizante o positiva (despolarizante), la membrana responde hiperpolarizándose o despolarizándose, respectivamente. En la mayoría de las neuronas existe una relación lineal entre la intensidad de corriente negativa y la hiperpolarización. Por el contrario, en el caso de la inyección de corriente positiva, el rango lineal solo es posible hasta antes del valor de potencial denominado umbral, en el cual se genera el disparo del PA (ver Sección 7.1.1.1). La relación entre la corriente y el voltaje es la resistencia, en términos biofísicos se denomina: Resistencia de Entrada ( $R_N$ ).

## **7.1.2. Propiedades activas de la membrana y excitabilidad neuronal**

### **7.1.2.1. Disparo repetitivo sostenido (DRS)**

El disparo repetitivo ha sido observado prácticamente en todas las regiones del SNC, en las distintas clases de neuronas que lo componen. Esta observación ha permitido determinar que existen neuronas que generan PAs espontáneos (Bean, 2007) y otras en las que el disparo se presenta únicamente bajo condiciones de estimulación (Kandel y Spencer, 1961). El disparo repetitivo consiste en una serie de PAs subsecuentes, que pueden tener diferentes intervalos entre sí y que son inducidos por estimulación presináptica (Bishop et al., 1953). La respuesta depende de la clase de neurona y el tipo de estimulación que reciba, por ejemplo, cuando algunas neuronas son estimuladas con un pulso supra umbral emiten en respuesta ráfagas de PAs que pueden presentar distintas frecuencias (Miles et al., 2005).

La estimulación capaz de inducir el disparo de PAs puede ser descrita en términos físicos: se le conoce como “reobase” a la cantidad mínima de energía capaz de generar una respuesta arbitraria. En términos biofísicos y para fines de este estudio, definiremos corriente reobase como: la corriente mínima necesaria capaz de producir un PA (Irnich, 2010). De esta manera, cuando se excede la corriente reobase (un pulso cuadrado de corriente inyectado a la célula a través del amplificador), se genera un tren de PAs consecutivos. Al seguir aumentando la intensidad de la inyección de corriente, se observa que el intervalo entre PAs se acorta y, en consecuencia, la frecuencia de disparo aumenta. A esta relación entre la corriente inyectada y la frecuencia se le llama Curva Corriente-Frecuencia (I-F) (Koch, 2004).

Un tren de PAs producido en respuesta a estímulos de intensidad y duración constantes, es denominado Disparo Repetitivo Sostenido (DRS). El DRS se define como la generación de más de un PA en respuesta a un pulso cuadrado de corriente despolarizante. Este fenómeno se denomina de esa manera porque la ráfaga de PAs se sostiene durante el tiempo que el estímulo es presentado. Esta es una

característica dependiente del voltaje y no dependiente de transmisión sináptica. En el SNC se conocen diversos tipos de neuronas que presentan esta propiedad (Macdonald et al., 1985).

Una de las características más interesante que comparten distintos FAEs utilizados en la clínica, es su capacidad para limitar el DRS (McLean y McDonald, 1984; Porter y Meldrum, 2015). Este efecto se ha descrito en fármacos con diferente mecanismo de acción y se propone que contribuye a la acción anticonvulsiva. En particular, se sabe que las benzodiazepinas (McLean y Macdonald, 1988), la PHT (McLean y Macdonald, 1983), el Valproato de Sodio (VPA) (McLean y McDonald, 1984), la Carbamazepina (CBZ) (McLean y Macdonald, 1986) y otros FAEs (Norris y King, 1997) son capaces de limitar el DRS. El efecto de “limitación del DRS” consiste en que al aplicar el FAE se induce una reducción significativa del número de PAs provocados por un pulso de corriente (Porter y Meldrum, 2015).

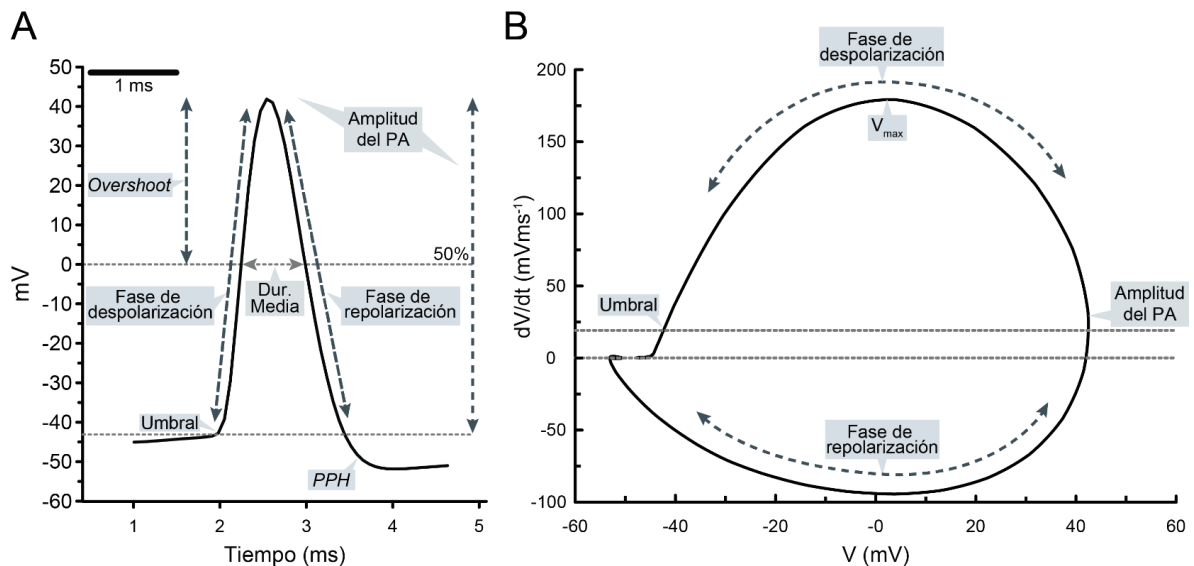
### **7.1.2.2. Dinámica del potencial de acción**

Al estimular una neurona y alcanzar el umbral de disparo, esta responde con un cambio dinámico o trayectoria de voltaje estereotipada que refleja las propiedades de membrana, este fenómeno es llamado Potencial de Acción (PA). Esta respuesta todo o nada, se origina en el cuerpo celular o cerca del mismo y se propaga por el axón a una amplitud y velocidad constantes (Koch, 2004). Los PAs exhiben distintas formas o dinámicas, dependiendo del tipo de neurona que lo genera. La forma de cada PA individual puede delimitar la frecuencia de disparo neuronal. Por ejemplo, las interneuronas GABAérgicas presentan PAs cortos, lo que les permite disparar a una frecuencia mayor que neuronas piramidales (Bean, 2007). Por su parte, dicha dinámica del PA es modulada por las distintas conductancias presentes en cada neurona (Storm, 1987).

Una estrategia para el análisis detallado de las propiedades dinámicas de los PAs es la de graficar la velocidad de cambio en el voltaje ( $dV/dt$ , medida en mV/ms)



contra el potencial de membrana instantáneo en mV (Bean, 2007). Este tipo de análisis es llamado gráfica de fase o *phase plot* (Jenerick, 1963) y permite una evaluación cuantitativa de las propiedades dinámicas del PA (Figura 9). En la gráfica de fase, el PA individual se representa como una curva cerrada de forma irregular. El punto inicial representa el potencial de membrana ( $V_m$ ) seguido del umbral de disparo (deflexión abrupta); en el extremo derecho se representa la amplitud máxima del PA; y las partes superior e inferior de la curva representan la fase de despolarización y repolarización del PA, respectivamente (Figura 9) (Trombin et al., 2011).



**Figura 9. Análisis de gráfica de fase del Potencial de Acción. A)** Trazo representativo de un PA individual, con la representación de sus componentes. **B)** Representación de gráfica de fase del PA mostrado en el panel izquierdo, se muestran los componentes respectivos.

## 7.2. Justificación del experimento

En los experimentos previos se demostró que el PPB es capaz de suprimir la actividad epileptiforme en neuronas piramidales de CA1. El efecto principal es la reducción de la frecuencia de PAs de una manera concentración-dependiente. Sin embargo, se desconoce si la aplicación de PPB es capaz de modificar el DRS provocado por la inyección de estimulación directa (pulso cuadrado de corriente despolarizante). Tampoco se conoce la causa de la reducción en la excitabilidad intrínseca ni los efectos del PPB sobre las propiedades pasivas de la membrana. Además, no existe evidencia que demuestre que la aplicación de PPB intracelular tenga un efecto en la viabilidad celular, el PMR, así como la excitabilidad intrínseca neuronal. Existe evidencia que el PPB modula conductancias iónicas en cardiomiocitos (Ji et al., 2004) pero no hay indicadores de este efecto modulador en neuronas del SNC.

## 7.3. Metodología particular

Se midieron parámetros que permiten determinar las propiedades pasivas de la membrana celular en condiciones basales (control) y durante el efecto de PPB a distintas concentraciones:

- Potencial de Membrana en Reposo o PMR: Cambios en el voltaje monitoreados cada 5 min durante un periodo mayor a 45 min.
- Resistencia de Entrada ( $R_N$ ): pendiente generada por los 3 puntos formados por la respuesta en voltaje a pulsos cuadrados de -30, 0 y +30 mV, durante el estado estable. Los valores de la  $R_N$  se expresan en  $M\Omega$ .
- Constante de tiempo de la membrana ( $\tau_m$ ): definida como el tiempo que tardó la respuesta, a un pulso negativo, en alcanzar el 63% del voltaje final.

Adicionalmente, se midió el efecto del PPB en los siguientes parámetros de la excitabilidad intrínseca:

- Corriente Reobase: la corriente mínima necesaria en cada célula (a partir de su respectivo  $V_m$ ) para producir un PA.
- Frecuencia de disparo de PAs durante el DRS: se calculó el número de PAs por segundo (Hz) producidos por la inyección de pulsos cuadrados de corriente (desde el  $V_m$  y con intensidad creciente de 0 a 450 pA, en incrementos de 50 pA).
- Post-Potencial Hiperpolarizante (PPH): la amplitud de la repolarización que sigue al tren de disparos y el post-potencial hiperpolarizante que sigue al PA individual.
- “sag” activado por hiperpolarización y su rebote: inyectando un pulso hiperpolarizante de 300 pA y midiendo la diferencia entre la amplitud máxima y el voltaje en el estado de estabilización; el rebote fue medido como la diferencia entre el voltaje pre-estímulo y la amplitud máxima de la deflexión positiva al finalizar el pulso de corriente negativa.
- Propiedades cinéticas de PAs individuales: análisis de los gráficos de fase de los tres primeros PAs.
  - Amplitud.- diferencia en mV entre el umbral y el pico máximo del potencial de acción.
  - Duración media.- medida a la mitad de la amplitud.
  - Velocidad máxima de ascenso ( $V_{max}$ ).
  - Velocidad máxima de descenso.
- Umbral de disparo del PA: definido como el voltaje en el cual la velocidad de ascenso alcanza los 20 mV/ms.

Finalmente, con la intención de corroborar la identidad de las neuronas registradas por su ubicación y morfología, de manera aleatoria se incluyó biocitina (0.1 %) en la pipeta de registro y se realizó una identificación post-hoc.

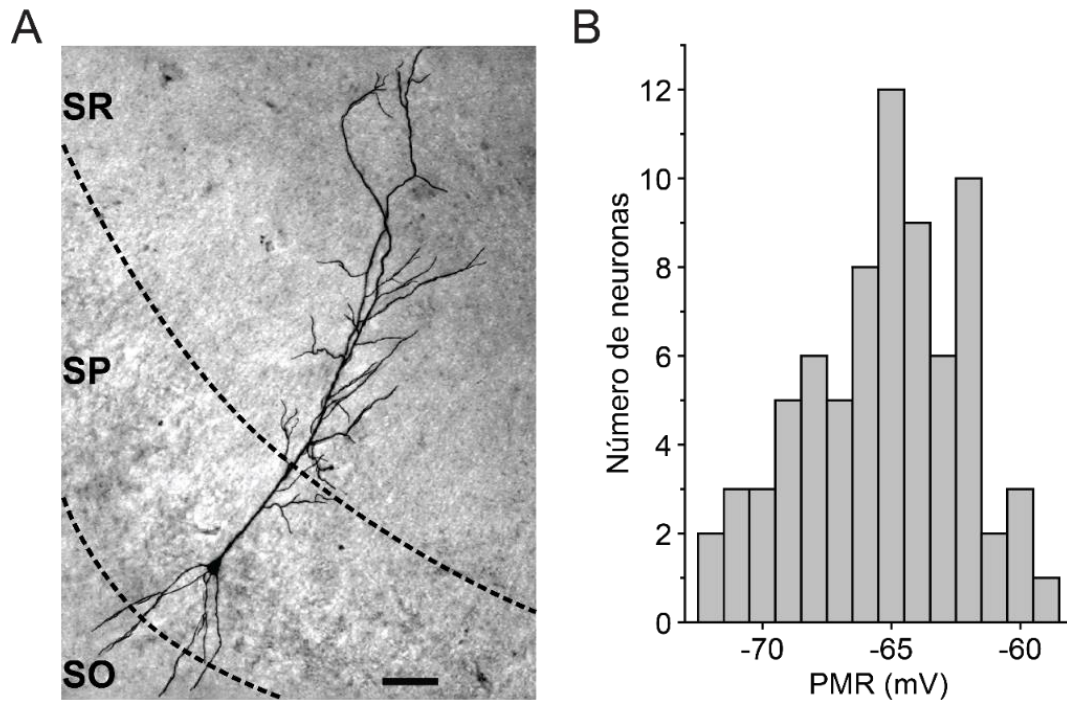
## **7.4. Resultados**

### **7.4.1. Caracterización de las neuronas registradas**

Se registraron 159 neuronas localizadas dentro del *stratum pyramidale* de la región CA1 del hipocampo. Se presenta el análisis de 72 de ellas, las cuales cumplieron con los parámetros mencionados en la Sección 5.2. Las neuronas registradas en condiciones control tuvieron una  $R_N$  de  $105.7 \pm 5.2 \text{ M}\Omega$  y su PMR fue de  $-65.3 \pm 0.3 \text{ mV}$ . Estas características van de acuerdo con los datos reportados en la literatura previa para neuronas de la misma clase (Henze y Buzsáki, 2001; NeuroElectro, 2016; Tripathy et al., 2015). Además, la reconstrucción post hoc de las neuronas marcadas con biocitina mostró un patrón morfológico que coincide con la ubicación y forma de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de la rata, como se muestra en la Figura 10 (panel A) (Spruston, 2008; Vladimirov et al., 2012).

#### **7.4.1. Efecto del PPB sobre las propiedades pasivas de la membrana**

En condiciones control, el PMR tuvo un valor de  $-65.2 \pm 2.1 \text{ mV}$  y la aplicación externa de PPB ( $200 \mu\text{M}$ ) en el LCRa no produjo cambios en este parámetro durante 45 min de monitoreo ( $-64.7 \pm 0.8 \text{ mV}$ ) ( $n = 3$ ). Este resultado indica que el PPB no reduce la excitabilidad a través de la modificación del PMR (hiperpolarizando las neuronas).



**Figura 10. Morfología y PMR de las neuronas piramidales registradas.**

**A)** Ejemplo de una neurona piramidal típica de la región CA1, la microfotografía en campo claro fue obtenida a partir de la reconstrucción post hoc con biocitina. El soma triangular característico se encuentra en el *stratum pyramidale* (SP), el segmento inicial del axón y dendritas basales en dirección al *stratum oriens* (SO) y las dendritas apicales en el *stratum radiatum* (SR). La barra de calibración corresponde a 50  $\mu\text{m}$ . **B)** Histograma del número de células y el PMR respectivo en condiciones control ( $n = 75$ ).

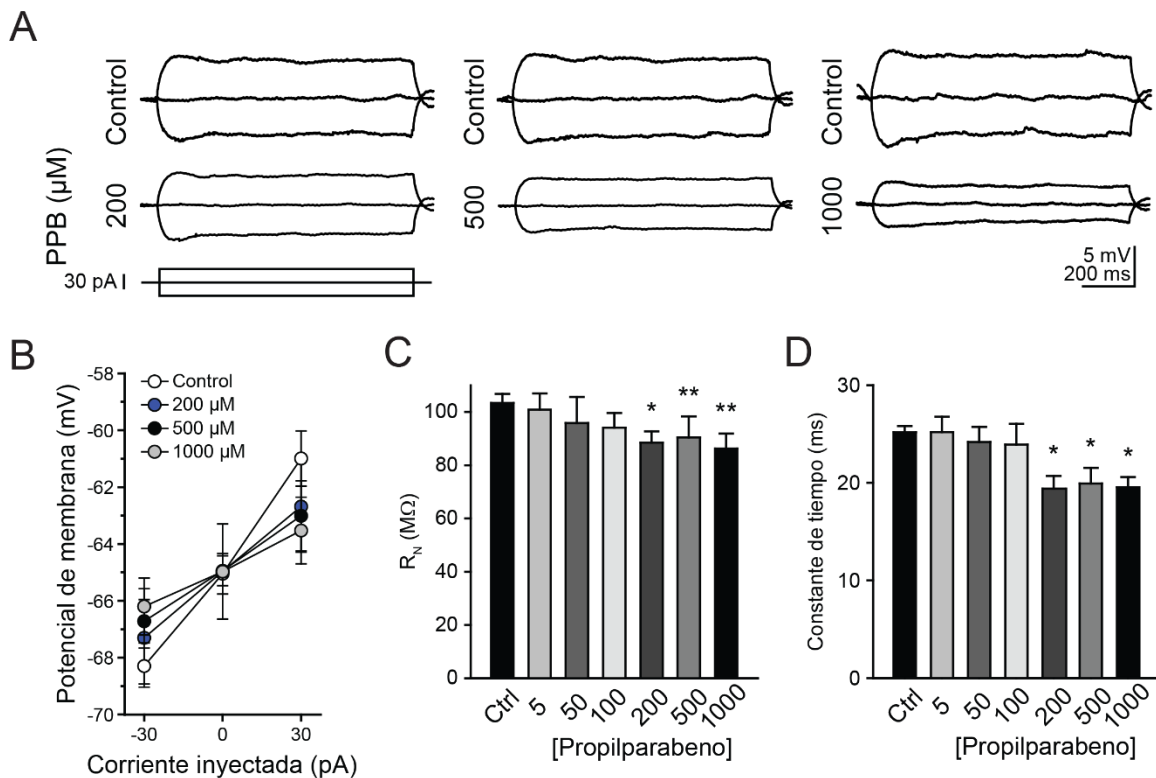
#### 7.4.1.1. Resistencia de entrada

La aplicación de PPB (5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$ ) indujo una disminución concentración-dependiente de la  $R_N$  de las neuronas piramidales, como se observa en los trazos de la Figura 11 (Paneles A y B). La concentración de

1000  $\mu\text{M}$  redujo un 24% ( $p < 0.01$ ). Los cambios en la  $R_N$  producidos por la aplicación de PPB a distintas concentraciones se muestran en la Figura 11 y los valores promedio se resumen en la Tabla 6.

#### 7.4.1.2. Constante de tiempo de la membrana ( $\tau_m$ )

En condición control, la constante de tiempo de la membrana tuvo un valor de  $25.1 \pm 0.6$  ms que se redujo al aplicar PPB. Por ejemplo, la concentración de 1000  $\mu\text{M}$  indujo una reducción del 22%, como se muestra en la Figura 11 (panel E). Los cambios en la  $\tau_m$  con las diferentes concentraciones de PPB están resumidos en la Tabla 6.



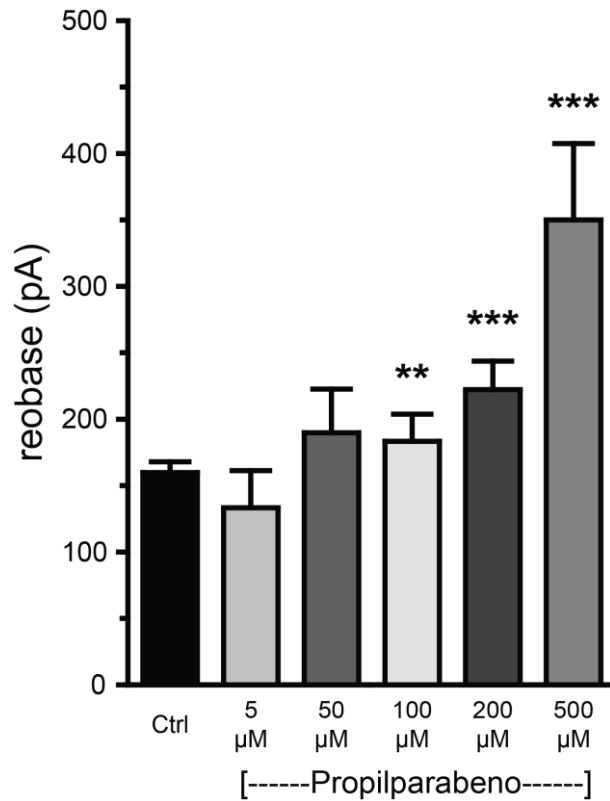
**Figura 11. Propiedades pasivas de la membrana de las neuronas piramidales de la región CA1. A)** Respuestas a la inyección de corriente de 30, 0 y -30 pA por 1000 ms en condiciones control (trazos superiores) y en presencia de PPB (trazos inferiores) a las concentraciones indicadas.

**B)** Promedio de las respuestas en condiciones control (círculos abiertos) y en presencia de PPB a las concentraciones indicadas en el inserto. **C)** Gráfica de barras que muestra el efecto del PPB a distintas concentraciones en la  $R_N$ . **D)** Resumen del efecto del PPB en la  $\tau_m$  donde se aprecia la disminución producida por la concentración de PPB 200  $\mu\text{M}$  en adelante. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  contra el control,  $n = 45$ .

## **7.4.2. Efecto del PPB sobre excitabilidad intrínseca neuronal**

### **7.4.2.1. Efecto del PPB en la corriente reobase**

En condición control, la corriente reobase obtenida a un  $V_m$  de  $-65$  mV, tuvo un valor de  $158.8 \pm 8.1$  pA. La aplicación de PPB indujo un aumento concentración-dependiente. Por ejemplo, con la concentración de  $500$   $\mu\text{M}$  la corriente reobase experimentó un incremento del 120%, como se observa en la Figura 12. Los efectos del PPB a distintas concentraciones sobre este parámetro, se encuentran resumidos en la Tabla 6.



**Figura 12. El PPB aumenta en la corriente rebase.** Gráfica de barras que resume el efecto de concentraciones crecientes de PPB sobre la corriente rebase. Nótese que para la concentración de 500 μM fue necesario inyectar más del doble de corriente para provocar PAs. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  en comparación con el control,  $n = 45$ .

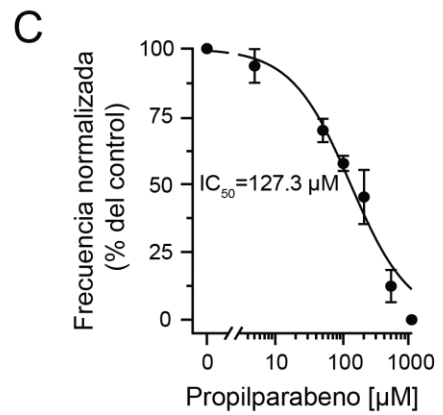
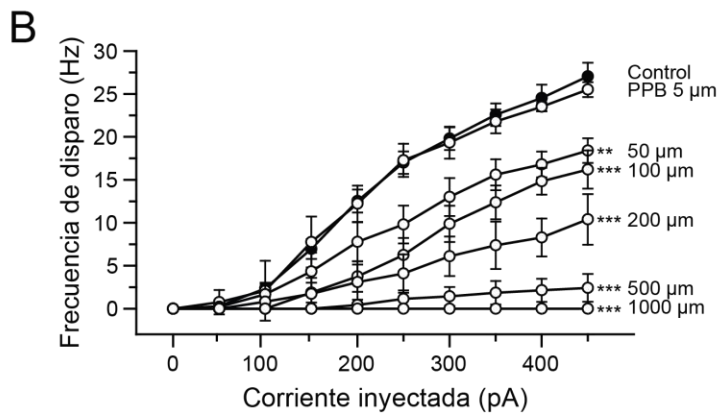
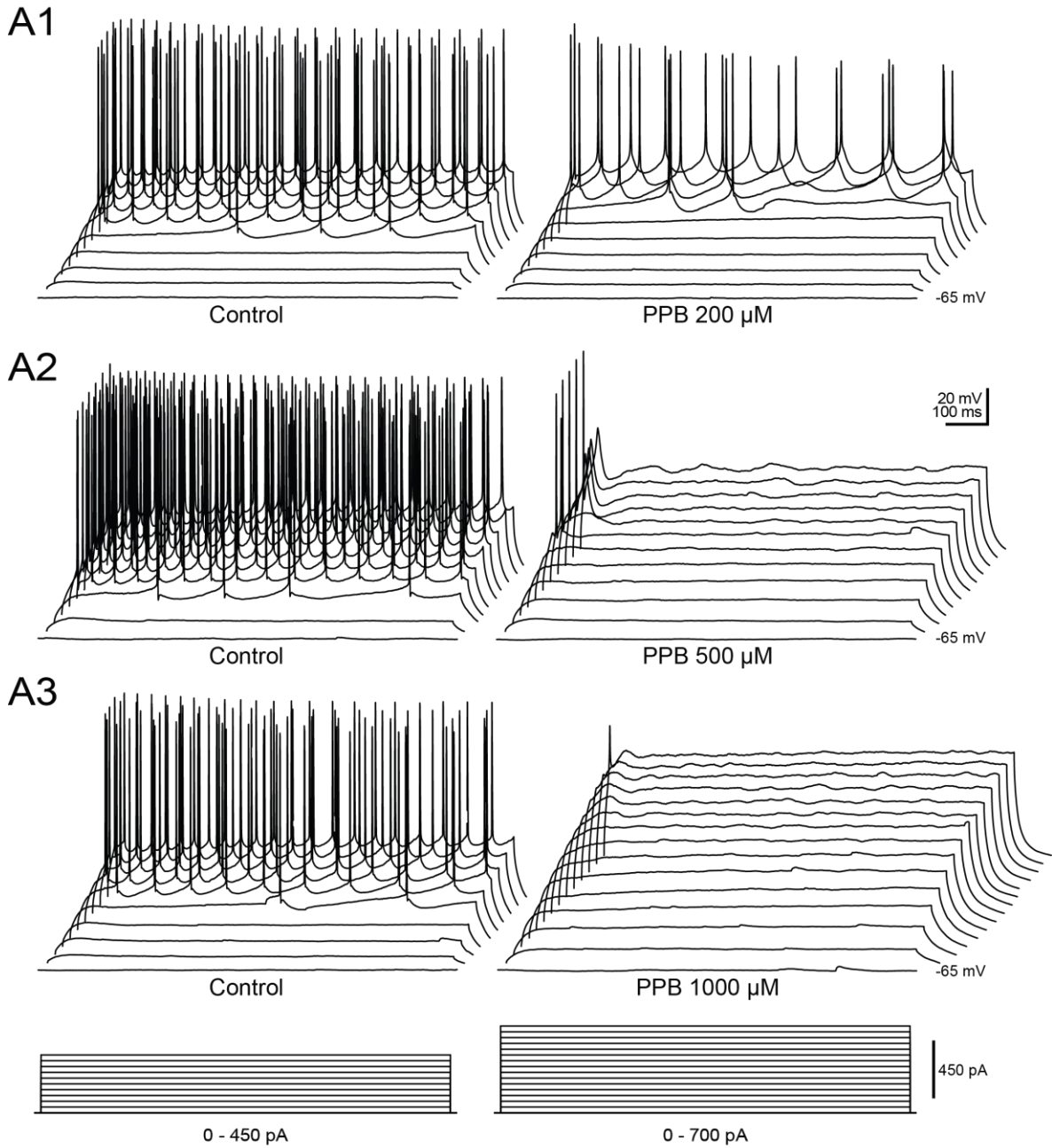
#### 7.4.2.2. Efecto del PPB sobre el Disparo Repetitivo Sostenido (DRS)

En un grupo de neuronas piramidales se inyectó un pulso cuadrado de corriente de 450 pA. Esta inyección causó un disparo repetitivo que alcanzó una frecuencia de  $27.04 \pm 1.5$  Hz. Posteriormente, se perfundieron concentraciones crecientes de PPB. El efecto final fue una disminución de la frecuencia de disparo de manera concentración-dependiente. Por ejemplo, la aplicación de PPB 200 μM



redujo la frecuencia de disparo en un 77% y la de 500  $\mu\text{M}$  en un 90% ( $p < 0.001$ ), como se muestra en la Figura 13 (Paneles A1 y A2). Además, es importante mencionar que la concentración de 1000  $\mu\text{M}$  abolió completamente el disparo neuronal, como se muestra en el panel A3 ( $p < 0.001$ ). La gráfica corriente-frecuencia con los efectos del PPB a distintas concentraciones se muestra en la Figura 13 (Panel B) y los valores resumidos en la Tabla 6.

Mediante una curva concentración-respuesta se calculó la Concentración Inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ). Para ello se comparó la frecuencia de disparo en respuesta a la inyección de corriente de 450 pA en condiciones control y en presencia de PPB a las distintas concentraciones probadas. Los valores fueron normalizados y graficados en función de la concentración del fármaco. La curva resultante tuvo un ajuste de  $r^2=0.972$  a la sigmoidea derivada de la ecuación de Hill y arrojó una  $\text{CI}_{50} = 127.3 \mu\text{M}$ , como se observa en la Figura 13 (Panel C).



**Figura 13. Efecto del PPB sobre el DRS de neuronas piramidales de la región CA1. A1-A3)** Trazos representativos del DRS producido por la estimulación con inyecciones de corriente en condiciones control (paneles a la izquierda) y bajo el efecto de la concentración indicada de PPB. Cada DSR es en respuesta a la inyección de pulsos cuadrados de corriente de 0 - 450 pA (700 pA en el caso del PPB 1000  $\mu$ M). Nótese que en la concentración de 500  $\mu$ M sólo se emite un PA inicial y la de 1000  $\mu$ M los suprime. **B)** Gráfica que representa la relación Corriente-Frecuencia en condiciones basales (círculos cerrados) y en presencia de distintas concentraciones de PPB. Nótese el efecto concentración-dependiente. **C)** Curva concentración-respuesta en la que se grafican los valores obtenidos por la inyección de 450 pA en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de PPB. La  $CI_{50}$  resultante fue de 127.3  $\mu$ M. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , respecto al control,  $n = 45$ .

**Tabla 6.**

Propiedades pasivas de la membrana, corriente reobase y frecuencia de disparo en condiciones control y en la presencia de PPB a concentraciones crecientes.

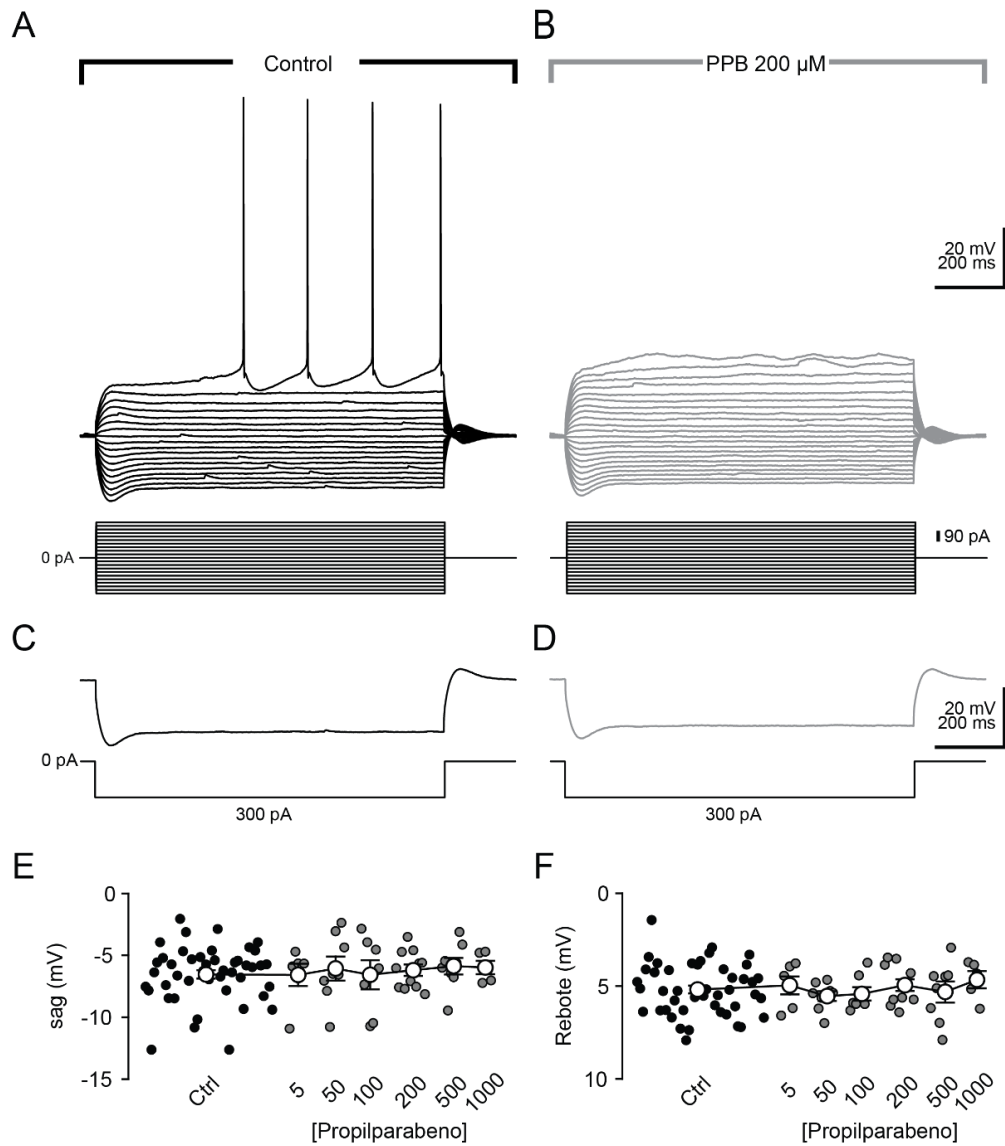
Parámetros	Control (n = 45)	PPB 5 $\mu\text{M}$ (n = 6)	PPB 50 $\mu\text{M}$ (n = 8)	PPB 100 $\mu\text{M}$ (n = 7)	PPB 200 $\mu\text{M}$ (n = 11)	PPB 500 $\mu\text{M}$ (n = 8)	PPB 1000 $\mu\text{M}$ (n = 5)
$V_m$ (mV)	-65.2 $\pm$ 0.6	-67.2 $\pm$ 1.1	-67.1 $\pm$ 1.7	-64.7 $\pm$ 0.5	-65.7 $\pm$ 0.6	-65.6 $\pm$ 0.7	-65 $\pm$ 0.4
$R_N$ (M $\Omega$ )	105.7 $\pm$ 5.2	104.1 $\pm$ 8.6	95.8 $\pm$ 9.7	116.4 $\pm$ 4.1	98.6 $\pm$ 18.0*	91.6 $\pm$ 8.7**	80.1 $\pm$ 12.1**
$\tau_m$ (ms)	25.1 $\pm$ 0.6	25.1 $\pm$ 1.5	24.1 $\pm$ 1.5	23.9 $\pm$ 2.1	19.3 $\pm$ 1.3*	19.9 $\pm$ 1.5*	19.5 $\pm$ 1.0*
sag (%)	6.3 $\pm$ 0.3	7.9 $\pm$ 1.1	5.9 $\pm$ 0.8	6.1 $\pm$ 0.9	6.9 $\pm$ 0.6	5.7 $\pm$ 0.6	6.1 $\pm$ 0.3
sag (mV)	-6.5 $\pm$ 0.3	-6.6 $\pm$ 0.9	-6.1 $\pm$ 0.9	-6.6 $\pm$ 1.1	-6.2 $\pm$ 0.4	-5.9 $\pm$ 0.6	-5.9 $\pm$ 0.5
Rebote sag (mV)	5.2 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.4	4.9 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 0.5
reobase (pA)	158.8 $\pm$ 8.1	158.3 $\pm$ 23.8	206.2 $\pm$ 17.5	207.1 $\pm$ 21.8*	227.2 $\pm$ 33.9**	350 $\pm$ 57.4***	N/A
Frecuencia de disparo (Hz)	27.04 $\pm$ 1.5	24.5 $\pm$ 4	16.5 $\pm$ 1.7**	15.4 $\pm$ 2.1**	6 $\pm$ 1.6 Hz***	2.7 $\pm$ 1.5***	0***

$V_m$ , potencial de mantenimiento;  $R_N$ , resistencia de entrada;  $\tau_m$ , constante de tiempo de la membrana; N/A, no aplica.

Todos lo valores se muestran en promedio  $\pm$  EE. \* p < 0.05 \*\*, p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 comparado contra el control.

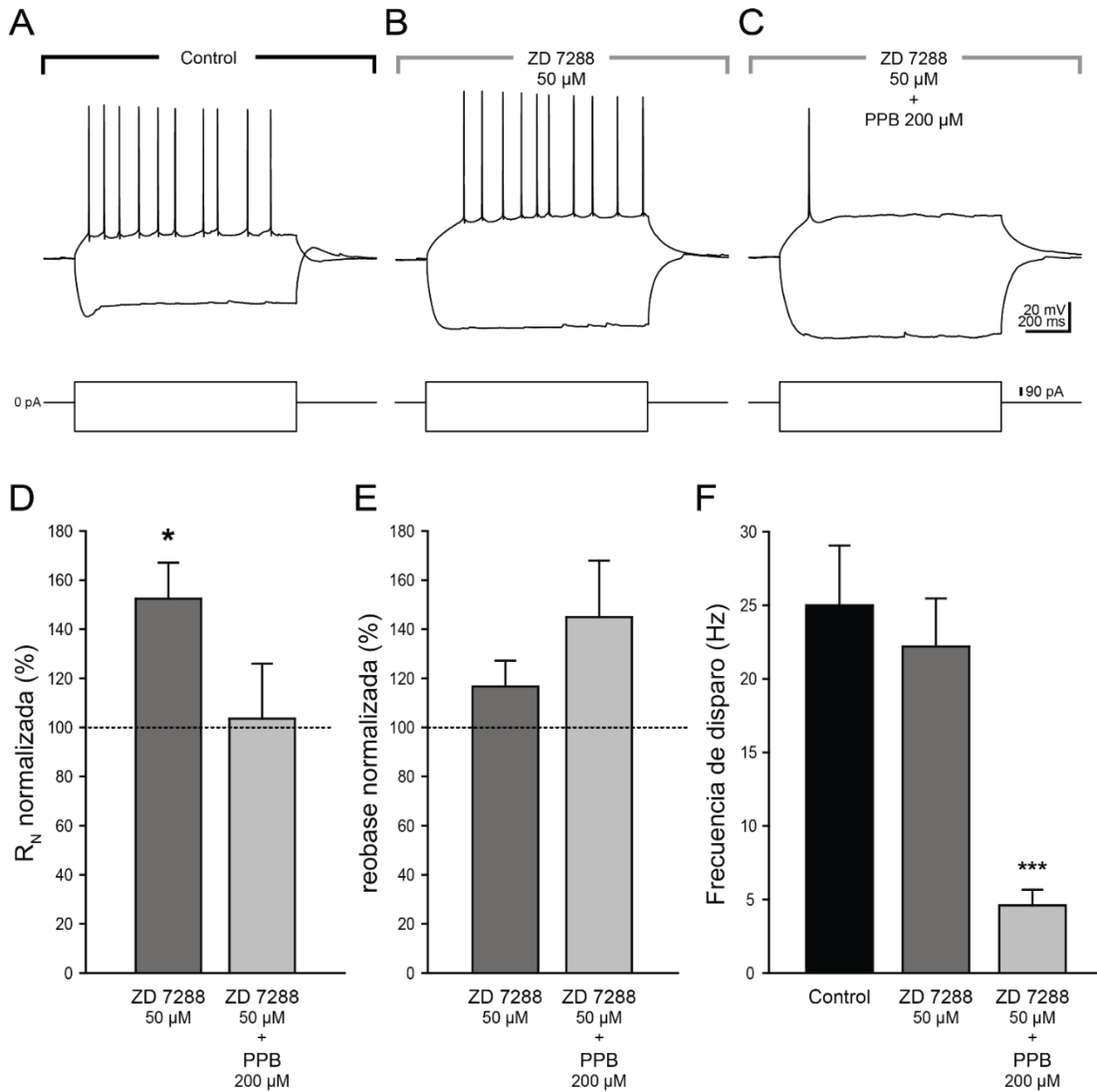
### 7.4.2.3. Efecto del PPB en el “sag” activado por hiperpolarización

Una de las conductancias que influye de manera directa la excitabilidad intrínseca de las neuronas hipocampales (Adams et al., 2009; Hu et al., 2002) y que también pueden regular las descargas epileptiformes (Albertson et al., 2013), es la mediada por los canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN). Dichos canales son los responsables de la corriente  $I_h$  en neuronas piramidales de la región CA1 (Maccaferri y McBain, 1996). Esta corriente puede observarse como un rebote pronunciado y anómalo (también conocido como “sag” en inglés, cuyo significado es “hundimiento” o “flexión”) durante la aplicación de un pulso de corriente negativo de alta intensidad. Al terminar el pulso, se puede observar un “rebote” que lleva a la membrana a un potencial positivo, en el que se pueden generar PAs. Para determinar si el PPB podría modificar la excitabilidad neuronal a través de la modulación de la  $I_h$ , en esta sección se midió el sag activado por hiperpolarización en presencia de PPB. En primer lugar, se provocó una respuesta con un pulso hiperpolarizante de 300 pA, se midió diferencia entre el pico de la respuesta y el estado estacionario después del sag, como se muestra en la Figura 14 (Paneles C y D). El análisis de los resultados indicó que las distintas concentraciones de PPB no alteraron la amplitud del sag (Panel E), esta observación fue corroborada a través de un análisis normalizado por célula individual, como se resume en la Tabla 6. Además, al comparar la amplitud del rebote que sigue el pulso hiperpolarizante (Panel F), tampoco se observó efecto del PPB a ninguna de las concentraciones probadas.



**Figura 14. El PPB no afecta el sag activado por hiperpolarización o su rebote. A-B)** Trazos representativos de la respuesta a la inyección de pulsos cuadrados de corriente de -300 a 300 pA en incrementos de 30 pA, en condición control (A) y durante el efecto de PPB a una concentración de 200 μM (B). **C-D)** Comparación de la respuesta al pulso hiperpolarizante de 300 pA en condición control (C) y con PPB (D). **E-F)** Gráficas de dispersión que ilustran los valores de la amplitud del sag (E) y su rebote (F) en condiciones control (círculos negros) y con PPB a las concentraciones indicadas abajo (círculos grises), así como el promedio sobrepuesto para cada concentración (círculos abiertos),  $n = 45$ .

En experimentos adicionales, donde se empleó ZD 7288, un fármaco que bloquea selectivamente los canales HCN en neuronas. Este bloqueo suprime selectivamente la corriente  $I_h$  en neuronas piramidales de CA1 (Eslamizade et al., 2015), es decir que suprime el sag característico como se observa en la Figura 15 (Paneles A y B). Para discernir los efectos del PPB respecto al ZD 7288, se compararon los efectos de ambos fármacos en la excitabilidad intrínseca neuronal ( $n = 5$ ). Los resultados indicaron que el ZD 7288 tiene efectos distintos y en algunos casos opuestos a los del PPB. Por ejemplo, al suprimir el sag con la aplicación de ZD 7288 no se observó una reducción en la frecuencia de disparo (frecuencia control =  $25 \pm 4.0$  Hz; en presencia de ZD 7288 =  $22.2 \pm 3.2$  Hz;  $p > 0.05$ ), como se muestra en los trazos de la Figura 15 (Paneles A, B). Sin embargo, la aplicación de PPB 200  $\mu$ M indujo la reducción de la frecuencia de disparo característica de  $4.6 \pm 1.0$  Hz, como se observa en el Panel F de la misma Figura ( $p < 0.001$ ). Por otra parte, la aplicación de ZD 7288 provocó un aumento de la  $R_N$  del 52% ( $p < 0.05$ ) que experimentó una reducción al aplicar PPB, como se observa en la Figura 15 (Panel A). Por otro lado, el ZD 7288 no provocó cambios significativos en la reobase respecto al control ( $p > 0.05$ ), a diferencia del PPB que indujo un aumento del 45% con respecto al control ( $p > 0.05$ ) (Panel B). Estos resultados en conjunto, indican que el PPB no modula la activación de la corriente  $I_h$  de las neuronas piramidales de CA1.



**Figura 15. El PPB no modula la  $I_h$  en las neuronas piramidales de CA1.**

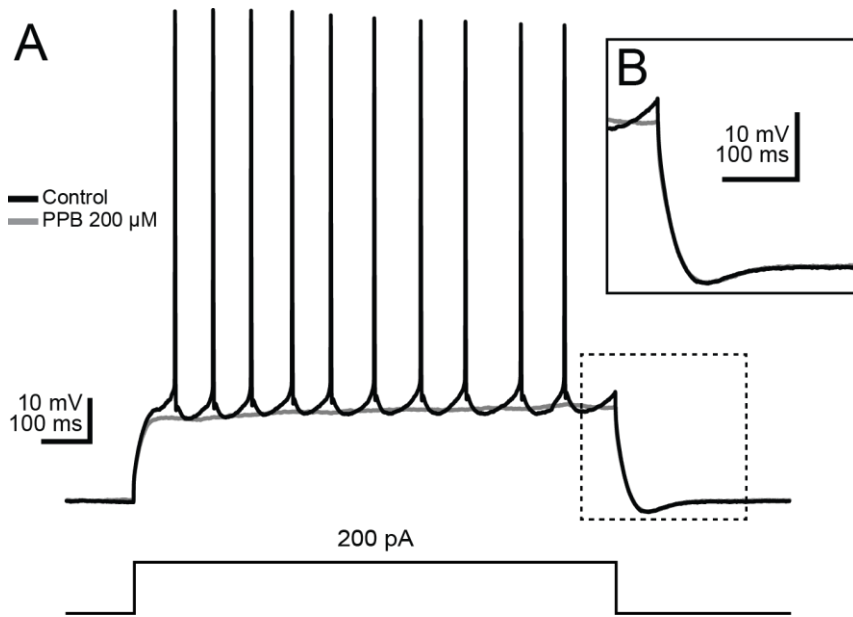
**A-C)** Trazos representativos de la respuesta a la inyección de pulsos cuadrados de corriente de -300 y 250 pA, en condición control (**A**), durante la aplicación del bloqueador de la  $I_h$ , ZD 7288 (**B**) y al añadir PPB a una concentración de 200  $\mu$ M (**C**). **D-F)** Comparación de los valores normalizados respecto al control de la  $R_N$  (**D**) y la corriente rebase (**E**) en presencia de ZD 7288 y al añadir PPB a la concentración indicada. **F)** Frecuencia de disparo máxima con una inyección de corriente despolarizante de 450 pA en presencia de ZD7288 y al añadir PPB. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , respecto al control,  $n = 5$ .



#### **7.4.2.4. Efecto del PPB sobre el Post-Potencial Hiperpolarizante (PPH)**

La frecuencia de disparo neuronal está determinada en gran parte por la duración del Post-potencial Hiperpolarizante (PPH), una repolarización membranal que se observa inmediatamente después de terminar el PA. Durante el PPH la probabilidad de que una neurona genere un disparo de manera espontánea es prácticamente nula, ya que se encuentra en un potencial negativo y se encuentran inactivadas las corrientes necesarias para la despolarización que precede un PA. El PPH tiene varias fases y esta mediado por la activación de corrientes de K activadas por  $Ca^{2+}$  (Sah, 1996).

Para determinar si la disminución en la excitabilidad observada en presencia de PPB, se debía a la modulación del PPH, se midió el PPH en control y en presencia de PPB. En este caso se midió la amplitud del PPH que sigue a un tren de disparos en respuesta a un pulso cuadrado despolarizante. En la Figura 16 se muestra el efecto del PPB 200  $\mu$ M sobre la amplitud de la PPH y en la Tabla 7 se muestra el valor promedio en condiciones control y durante la aplicación de las distintas concentraciones de PPB utilizadas. El análisis de resultados indicó que la aplicación de PPB no modificó significativamente este parámetro, aún a las concentraciones más altas.



**Figura 16. El PPB no tiene efecto en la PPH post tren de disparos. A)** Trazos representativos de un tren de disparos provocado por la inyección de un pulso cuadrado de corriente de 200 pA en condiciones control (trazo negro) y durante la aplicación de PPB 200  $\mu$ M (trazo gris) ( $n = 6$ ). **B)** Inserto que muestra la sección expandida denotada por el recuadro punteado del trazo en **A**. Nótese la sobreposición de ambos trazos que demuestra la falta de efecto en este parámetro.

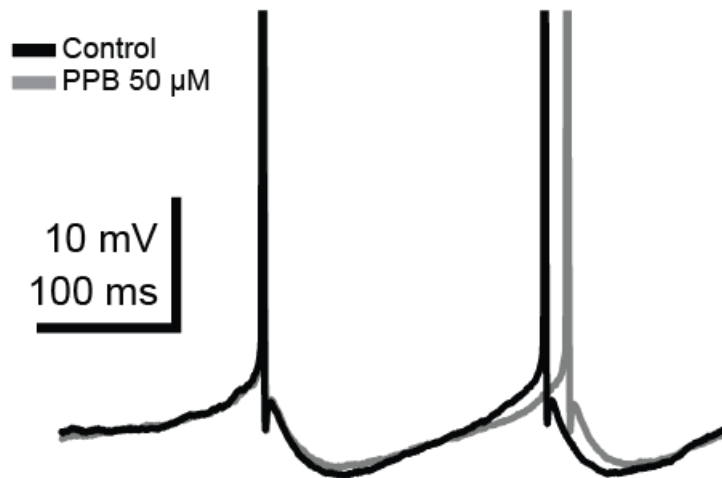
Además, se midió la amplitud, la duración media y el área total que sigue a la PPH después de cada PA individual. Los cambios en este fenómeno también pueden modificar la frecuencia de disparo y modificar la excitabilidad neuronal (Sah, 1996). En la Figura 17 se muestran los trazos representativos, el análisis mostró una diferencia significativa en el área total del PPH en presencia de 50  $\mu$ M de PPB ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, esta diferencia es atribuible al aumento del intervalo que separa a cada PA individual, ya que la amplitud no presentó diferencias significativas. Los promedios de cada uno de estos valores se resumen en la Tabla 7.

**Tabla 7.**

Efecto del PPB en la PPH que sigue a un tren de disparos y la que sigue al PA individual.

Parámetro	Amplitud PPH Post-tren de disparo						
	Control (reobase)	PPB 5 $\mu$ M	PPB 50 $\mu$ M	PPB 100 $\mu$ M	PPB 200 $\mu$ M	PPB 500 $\mu$ M	PPB 1000 $\mu$ M
Amplitud (mV)	-4.9 $\pm$ 0.3	-4.9 $\pm$ 0.6	-4.39 $\pm$ 0.3	-4.8 $\pm$ 0.6	-5.1 $\pm$ 0.7	-4.5 $\pm$ 0.8	-4.7 $\pm$ 0.3
	<b>PPH Post AP</b>						
	Control (reobase)	PPB 5 $\mu$ M	PPB 50 $\mu$ M				
Amplitud (mV)	-6.8 $\pm$ 0.3	-7.1 $\pm$ 0.5	-8.1 $\pm$ 0.8				
Duración media (ms)	95.2 $\pm$ 7.01	98.1 $\pm$ 7.3	103.9 $\pm$ 10.01				
Área (mV · ms)	-630.2 $\pm$ 59.9	-707.1 $\pm$ 56.1	-949.1 $\pm$ 139.5*				

PPH, Post-Potencial hiperpolarizante; PPB, propilparabeno; AP, potencial de acción. Todos lo valores se muestran en promedio  $\pm$  EE. \* p < 0.05 comparado con el control.



**Figura 17. El PPB no tiene efecto en la PPH post AP.** Trazos representativos de la PPH que sigue al PA individual en condición control (trazo negro) y durante la aplicación de PPB 50  $\mu$ M (trazo gris) ( $n = 8$ ).

#### 7.4.2.5. Efecto del PPB sobre la dinámica del PA

Durante el DSR se observaron cambios en la dinámica de los PAs sucesivos. Por esta razón, en el siguiente grupo de experimentos se analizó la dinámica de los PAs individuales. Se examinaron los PAs evocados por la corriente reobase (1x reobase) y el doble de dicha corriente (2x reobase). De esta manera se obtuvieron PAs suficientes para realizar las comparaciones necesarias.

Al inyectar 1x reobase, el umbral de disparo en condición control tuvo un valor de  $-40.9 \pm 0.8$  mV y la aplicación de PPB provocó un aumento concentración-dependiente. Como se muestra en la Figura 18 (Panel B), la concentración de 50  $\mu$ M provocó un aumento del 16% en el umbral del primer PA ( $p < 0.05$ ) y la de 500  $\mu$ M un aumento del 52% ( $p < 0.001$ ). En la Tabla 8 se resumen

los valores promedio en condición control y en presencia de PPB sobre el efecto en el umbral de disparo. A continuación, se comparó el primer PA en condición control contra el primer PA obtenido con las distintas concentraciones de PPB. El PA control tuvo una amplitud de  $86.4 \pm 1.2$  mV y la concentración de 500  $\mu$ M la disminuyó un 22% ( $p < 0.01$ ). Esta concentración también disminuyó la  $V_{\max}$  y la velocidad de descenso ( $p < 0.05$ ), sin afectar significativamente la duración media, como se resume en la Tabla 8.

Debido a que la aplicación de PPB provocó cambios en los PAs sucesivos, se compararon los parámetros dinámicos del primer PA contra el segundo y tercer del mismo tren de disparo. En condiciones control, la amplitud se mantuvo sin cambios significativos hasta el octavo PA (ver Figura 18, Panel G1). Notablemente, las concentraciones de PPB 200 y 500  $\mu$ M produjeron una reducción progresiva en la amplitud de los PAs sucesivos sin afectar de manera importante el primero. Por ejemplo, la concentración de 200  $\mu$ M redujo en un 7% la amplitud del tercer PA ( $p < 0.05$ ). El mismo efecto se observó en la duración media, aumentando en el segundo y tercer PA (55% y 100%, respectivamente;  $p < 0.05$ ). Además, la  $V_{\max}$  del tercer PA disminuyó en un 19% ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, la velocidad de descenso de los PAs consecutivos no mostró modificaciones en presencia de PPB. La Tabla 8 resume los hallazgos encontrados con la inyección de 1x reobase.

**Tabla 8.**

Comparación del umbral y las propiedades del PA individual de las neuronas piramidales de la región CA1 en condiciones control y con la aplicación de PPB, con la inyección de 1x rebase.

Parámetros	Control			PPB 200 $\mu\text{M}$			PPB 500 $\mu\text{M}$		
	1.°	2.°	3.°	1.°	2.°	3.°	1.°	2.°	3.°
<b>Amplitud (mV)</b>	86.4 $\pm$ 1.2	86.4 $\pm$ 1.1	85.8 $\pm$ 1.0	82.4 $\pm$ 1.6	79.7 $\pm$ 2.1	76.8 $\pm$ 2.3*	67.3 $\pm$ 4.7 <sup>##</sup>	51	42.7
<b>Duración media (ms)</b>	1.4 $\pm$ 0.05	1.5 $\pm$ 0.06	1.6 $\pm$ 0.07	1.8 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.6*	3.6 $\pm$ 1.2*	1.7 $\pm$ 0.2	3.8	7.5
<b>V<sub>max</sub> (mV/ms)</b>	140.7 $\pm$ 3.9	136.4 $\pm$ 3.9	133.8 $\pm$ 3.8	115.8 $\pm$ 10.9	99.4 $\pm$ 13.4	93.2 $\pm$ 10.1*	94.7 $\pm$ 18.3 <sup>#</sup>	31.2	9.1
<b>Veloc. descenso (mV/ms)</b>	-65.9 $\pm$ 2.6	-61.1 $\pm$ 2.5	-60.2 $\pm$ 2.6	-50.1 $\pm$ 10.8	-43.9 $\pm$ 10.7	-41.6 $\pm$ 11.4	-41.0 $\pm$ 9.4 <sup>#</sup>	-17.1	-3.95
<b>Umbral de disparo del 1.° PA</b>	Control			<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>200 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>500 <math>\mu\text{M}</math></b>	
	-40.9 $\pm$ 0.8			-41.17 $\pm$ 1.1	-34.6 $\pm$ 2.1*	-35.6 $\pm$ 2.7**	-34.9 $\pm$ 2.8**	-19.6 $\pm$ 2.7***	

Todos los valores representan la media  $\pm$  E.E.

# p < 0.05, ## p < 0.01 al comparar contra el 1.° PA en condiciones control; \* p < 0.05 al comparar contra el 1.° PA del tren de disparos.

Con el objetivo de determinar el efecto del PPB sobre la dinámica de un número mayor de PAs consecutivos, se compararon los PAs producidos por la inyección de corriente de dos veces el valor de la corriente reobase para cada célula (2x reobase).

La comparación del primer PA en condición control contra los obtenidos aplicando PPB a las concentraciones de 200 y 500  $\mu\text{M}$  no arrojó diferencias significativas en la amplitud, la  $V_{\text{max}}$  ni la duración media entre los primeros PAs. Sin embargo, la concentración de PPB de 500  $\mu\text{M}$  redujo la velocidad de descenso en un 28% con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

A continuación, se comparó el segundo y tercer PA contra el primer PA de cada ráfaga. En condiciones control, sólo se encontraron diferencias en la velocidad de descenso del segundo y tercer PA ( $p < 0.05$ ). La aplicación de PPB (200 y 500  $\mu\text{M}$ ) redujo significativamente los cuatro parámetros medidos a partir del segundo PA, como muestra la Figura 18 (Panel A). Es destacable que el mayor cambio se observó en la  $V_{\text{max}}$ , la cual que se redujo en 46% ( $p < 0.001$ ). En la Figura 18 (Paneles C-F) se muestran las gráficas de la comparación de los parámetros dinámicos del PA y el efecto del PPB sobre los mismos, además, los valores se resumen en la Tabla 9.

Para distinguir los cambios provocados en la dinámica del PA por la aplicación del PPB, se realizaron las gráficas de fase de PAs individuales. Como se muestra en la Figura 18 (Paneles G1 y G2), la dinámica individual de los PAs en condición control es estable. Sin embargo, en la misma Figura Paneles H1 y H2 se observa que la aplicación de PPB 200  $\mu\text{M}$  indujo cambios progresivos en la dinámica individual de los PAs sucesivos (cambios que son más evidentes en la gráfica de fase, Paneles G2-G3 y H2-H3). Estos resultados sugieren que el PPB induce un efecto uso-dependiente. En la Tabla 9 se resumen los valores comparativos de los primeros tres PAs de cada tren de disparos en condición control y el efecto del PPB a 200 y 500  $\mu\text{M}$ .

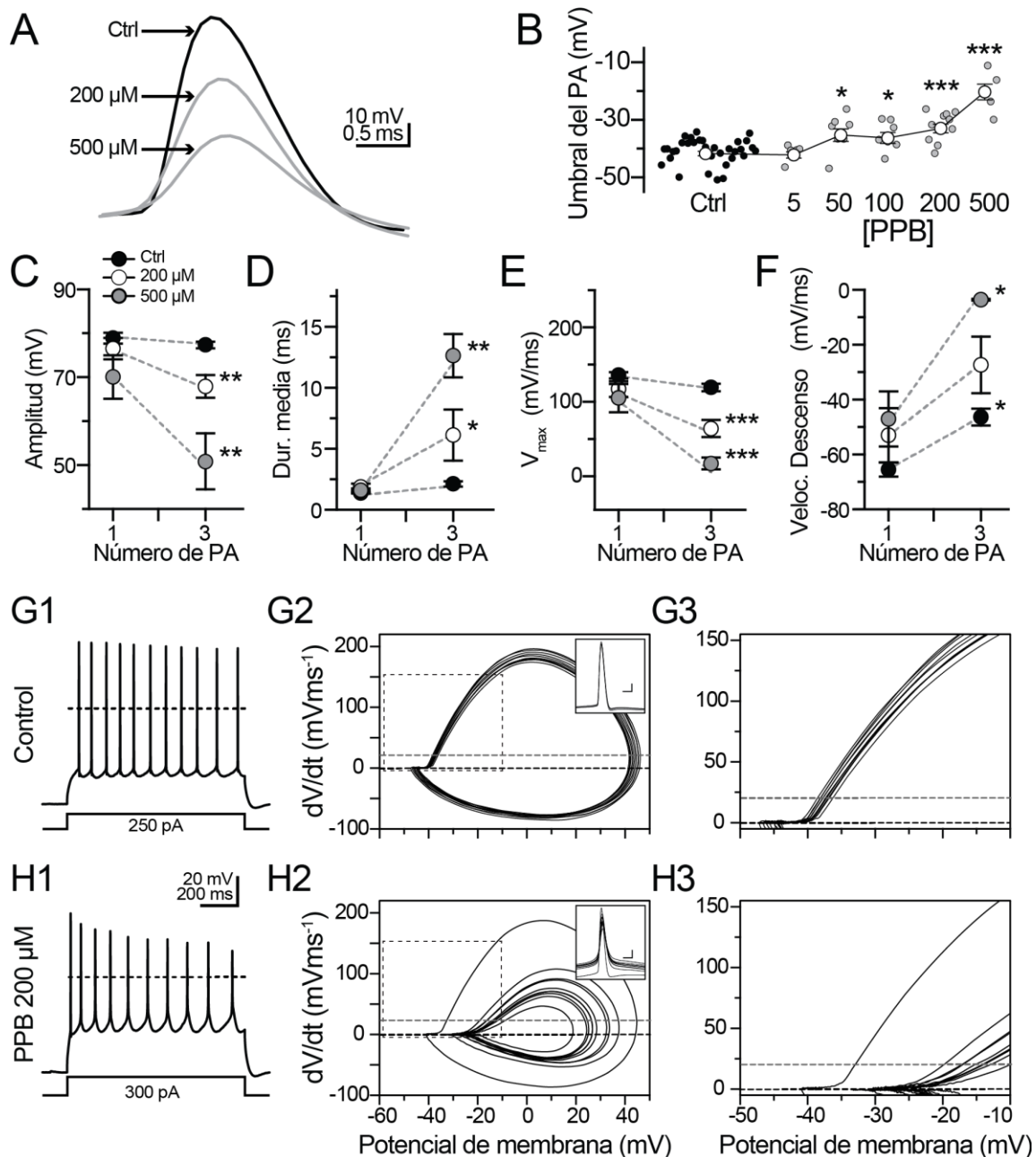
**Tabla 9.** Comparación de las propiedades del PA individual de las neuronas piramidales de la región CA1 en condiciones control y con la aplicación de PPB, con la inyección de 2x reobase.

Parámetros	Control			PPB 200 $\mu$ m			PPB 500 $\mu$ m		
	1.°	2.°	3.°	1.°	2.°	3.°	1.°	2.°	3.°
<b>Amplitud (mV)</b>	79.3 $\pm$ 1.0	78.4 $\pm$ 1.4	78.7 $\pm$ 1.0	76.4 $\pm$ 2.4	69.4 $\pm$ 2.9*	67.8 $\pm$ 2.5**	65.7 $\pm$ 7.9	55.6 $\pm$ 6.0**	50.8 $\pm$ 9.4
<b>Duración media (ms)</b>	1.3 $\pm$ 0.03	2.0 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 1.5***	6.1 $\pm$ 2.0***	1.5 $\pm$ 0.6	6.0 $\pm$ 1.6**	12.6 $\pm$ 1.7
<b>V<sub>max</sub> (mV/ms)</b>	135.6 $\pm$ 4.1	116.5 $\pm$ 5.6	119.2 $\pm$ 5.1	127.0 $\pm$ 10.5	68.7 $\pm$ 11.8***	64.1 $\pm$ 11.4***	140.7 $\pm$ 8.9	30.3 $\pm$ 0.9***	17.1 $\pm$ 7.9
<b>Veloc. descenso (mV/ms)</b>	-65.5 $\pm$ 2.5	-45.3 $\pm$ 2.8*	-46.4 $\pm$ 3.0*	-53.0 $\pm$ 9.8	-29.4 $\pm$ 9.9**	-27.4 $\pm$ 10.2**	-47.0 $\pm$ 10.1#	-10.5 $\pm$ 16.5*	-3.6 $\pm$ 0.3

Todos los valores representan la media  $\pm$  E.E.

# p < 0.05 al comparar contra el 1.° PA en condiciones control; \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 al comparar contra el 1.° PA del tren de disparos.





**Figura 18. El PPB modifica la dinámica del PA e induce un efecto uso-dependiente. A)** Trazos representativos de PAs en condiciones control (trazo negro) y en presencia de las concentraciones de PPB indicadas por las flechas (trazos grises). **B)** Gráfica de dispersión que resume los cambios inducidos por la aplicación de PPB a distintas concentraciones en el umbral de disparo. **C-F)** Gráficas que resumen el efecto del PPB en las distintas

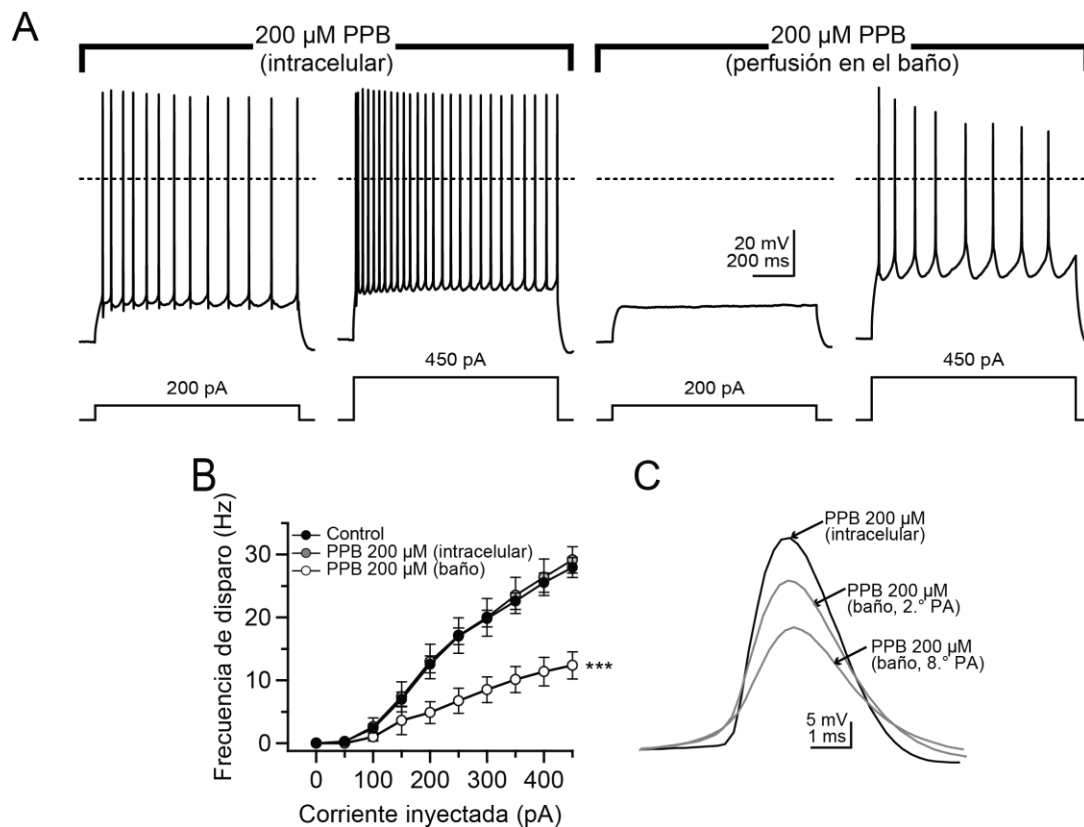
fases que componen el PA: la amplitud (**C**), duración media (**D**),  $V_{\max}$  (**E**) y velocidad de descenso (**F**). Nótese la disminución en la amplitud y la  $V_{\max}$ , principalmente. **G1, H1**) Trazos representativos del tren de disparos en respuesta a pulsos despolarizantes en condición control (**G1**) y en presencia de PPB a 200  $\mu\text{M}$  (**H1**). **G2-H3**) Análisis de gráfica de fase (*phase plot*) generado de los PAs representados a la izquierda en condiciones control (**G2**) y en la presencia de PPB (**H2**). En la magnificación se observa el efecto acumulativo que el PPB indujo en la amplitud y  $V_{\max}$  de cada PA sucesivo (**H3**) en comparación con el control (**G3**). Además, se observa un aumento en el umbral de disparo en cada PA sucesivo, cambio denotado por la intersección de la gráfica de fase con la línea punteada gris (20 mV/ms). El inserto en **G2** y **H2** muestra los PAs individuales sobrepuestos. Las barras de calibración en los insertos de **G2** y **H2** corresponden a 1.5 ms y 10 mV. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $n = 19$ .

#### 7.4.2.6. Efecto del PPB aplicado intracelularmente por difusión

En la siguiente serie de experimentos, se buscó determinar si la modulación de la excitabilidad neuronal se podría deber a una acción intracelular del fármaco. Por tal razón, se incluyó PPB 50 y 200  $\mu\text{M}$  en la solución interna de la pipeta de registro ( $n = 3$  y  $n = 4$ , respectivamente). Una vez realizado el sello de la pipeta con la membrana neuronal, se permitió su estabilización (y con ello la difusión intracelular del PPB) y se evaluó el disparo neuronal a los 5, 10, 20 y 40 minutos después de la ruptura del sello. Con respecto a los valores obtenidos previamente, la aplicación de PPB a ambas concentraciones no alteró el PMR, ni la frecuencia de disparo ( $28.6 \pm 2.5$  Hz). Además, al comparar la dinámica de los PAs consecutivos tampoco se encontraron diferencias significativas.

Con la finalidad de demostrar que el efecto del PPB se da cuando es aplicado en el lado extracelular de la membrana, en un grupo de células a las que se les difundió PPB 200  $\mu\text{M}$  intracelular, fueron adicionalmente expuestas a PPB (200  $\mu\text{M}$ ) disuelto en el LCRa ( $n = 8$ ). En la Figura 19 se muestran los trazos representativos

de la aplicación de PPB por difusión intracelular y la aplicación en el baño. Durante la aplicación intracelular no se observan los cambios característicos inducidos por el PPB descritos en la sección anterior. Por el contrario, el fármaco aplicado extracelularmente redujo la frecuencia de disparo en un 57% ( $12.3 \pm 2.1$  Hz;  $p < 0.001$ ), como se observa en la Figura 19 (Panel B). En conjunto, estos datos indican que el PPB ejerce efecto inhibitor de la excitabilidad sólo cuando es aplicado en el lado extracelular de la membrana neuronal.



**Figura 19. Efecto del PPB aplicado por diálisis intracelular y su aplicación posterior en el LCRa. A)** Trazos representativos de las respuestas producidas por la inyección de 200 y 450 pA en células a las que se les aplicó PPB (200 μM) intracelular (izquierda). Posteriormente, se les aplicó PPB (200 μM) en la perfusión extracelular del baño (derecha). Nótese la ausencia de efecto intracelular y la disminución en la frecuencia de disparo con la aplicación extracelular. **B)** Gráfica que representa la frecuencia de

disparo en función de la corriente inyectada en condiciones control (serie de experimentos anterior, representados en círculos cerrados), PPB intracelular (círculos grises) y la aplicación de PPB extracelular (círculos abiertos). Nótese que la frecuencia de disparo permanece sin cambios cuando se aplicó PPB intracelular y la disminución producida por su aplicación en el LCRa. **C)** Trazos representativos un PA durante la aplicación intracelular (trazo negro) y la sobreposición de trazos de PAs consecutivos durante la aplicación extracelular de PPB 200  $\mu\text{M}$  (trazos grises). \*\*\*  $p < 0.001$ , contra el PPB intracelular,  $n = 8$ .

## 7.5. Discusión

Los resultados de este experimento concuerdan con la supresión de la actividad epileptiforme (Capítulo 6). En este caso demostramos que la presencia de PPB indujo una clara reducción en la excitabilidad de las neuronas piramidales, como lo evidencia el incremento significativo en la corriente reobase, haciendo necesario inyectar una mayor cantidad de corriente conforme se incrementó la concentración de PPB. También se observó un incremento en el umbral de disparo, provocando que las neuronas emitieran PAs a potenciales cada vez más despolarizados. Estas dos variables en conjunto, produjeron que las neuronas fallaran en emitir PAs consecutivos en respuesta a pulsos cuadrados de corriente; lo cual corrobora el efecto limitante del PPB en el DRS. De hecho, este efecto es compartido con diversos FAEs, incluyendo la PHT, el VPA y CBZ (Macdonald, 1989). Estos resultados concuerdan con el único estudio donde se probó el efecto del PPB en SN de rana, donde se describió que la aplicación de PPB, a una concentración de 1 mM, bloquea completamente la conducción eléctrica del nervio periférico aislado; coincidiendo con la concentración de lidocaína (1 mM) que tuvo el mismo efecto (Kitamura, 1979); y coincide con la concentración que abolió el disparo neuronal en el presente estudio. A partir de la concentración de PPB a 50  $\mu\text{M}$  produjo una disminución significativa en la frecuencia de disparo.

Además de limitar el DRS, observamos que la aplicación de PPB ocasionó una serie de modificaciones en la dinámica de los PAs sucesivos, disminuyendo su amplitud y  $V_{max}$ , principalmente. A este efecto característico se le ha llamado uso-dependencia y consiste en que los PAs de un tren son alterados progresivamente. El primer potencial de acción permanece sin alteración, pero cada PA subsecuente tiene menor amplitud y  $V_{max}$ . Eventualmente el disparo es suprimido durante la despolarización (Macdonald, 1989). Además, la disminución de la  $V_{max}$  es utilizada como indicador de una reducción en la conductancia de  $Na^+$  (McLean y Macdonald, 1988; Naundorf et al., 2006; Strichartz y Cohen, 1978). El PPB afectó este parámetro de manera importante, efecto que coincide con otros fármacos como la PHT (Raza et al., 2004), la lidocaína (Capek y Esplin, 1994) y la tetrodotoxina (TTX) (Elharrar, 1988; Huang et al., 2012; Naundorf et al., 2006). Dichos compuestos bloquean canales  $Na_v$  principalmente.

Adicionalmente, no encontramos efecto significativo del PPB sobre los parámetros medidos del PPH. La falta de efecto nos indica que el PPB no modula las corrientes de potasio dependientes de calcio ( $I_{KCa}$ ). Por lo que podemos descartar que la modulación de la excitabilidad neuronal por PPB se deba a una regulación del PPH, afectando la frecuencia de disparo (Cloues y Sather, 2003).

Los resultados también mostraron que el PPB disminuye la  $R_N$ , apoyando la noción que el PPB reduce la excitabilidad neuronal limitando la magnitud de los cambios pasivos del potencial de membrana. Sin embargo, este efecto sólo se encontró a las concentraciones más altas, sugiriendo que PPB a concentraciones mayores podría modular canales iónicos activados cerca al PMR, efecto que también se ha observado con lidocaína (Schwarz y Puil, 1998) y PHT (Ayala et al., 1977). Es necesario profundizar en esta observación, analizando el efecto del PPB sobre las corrientes de los canales de  $K^+$  tipo A y M; ya que estas corrientes modulan la excitabilidad neuronal (Xie et al., 2013). Por otra parte, el PPB redujo la duración de la constante de tiempo de la membrana, un parámetro utilizado usualmente para caracterizar la escala de tiempo en la que una neurona particular responde y es capaz de integrar temporalmente las entradas sinápticas (Holt et al., 1997).

Resultado que sugiere que las neuronas tienen un menor tiempo para la integración de entradas sinápticas excitadoras en presencia de PPB.

La aplicación intracelular de PPB no afectó ninguno de los parámetros medidos. Este efecto también se ha observado con otros fármacos, particularmente la PHT, CBZ y lamotrigina (LTG) (Jo y Bean, 2014; Kuo, 1998), y toxinas como la TTX (Fozzard y Lipkind, 2010), cuyo mecanismo de acción principal es el bloqueo de canales  $Na_v$ .

En este objetivo definimos el mecanismo celular por el cual el PPB suprime la actividad epileptiforme: limitando el DRS de una manera uso-dependiente. Queda por definir el mecanismo de acción molecular por el que este compuesto ejerce dicho efecto. En ese sentido, los principales resultados de este objetivo son consistentes con un posible bloqueo de las corrientes de  $Na^+$  de inactivación rápida, por lo cual decidimos como siguiente objetivo, analizar el efecto del PPB en diferentes estados funcionales de los canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje ( $Na_v$ ).

## **8. EXPERIMENTO 3. Efecto del PPB sobre las corrientes de Na<sup>+</sup>**

### **8.1. Introducción**

La señalización eléctrica controla la contracción muscular, la secreción hormonal, recibir y procesar señales ambientales o internas, el procesamiento de información en el cerebro y la generación de respuestas en tejidos y órganos periféricos (Catterall et al., 2007). Particularmente, la transmisión y procesamiento de información en el SN depende, en gran medida, de los canales iónicos expresados en las neuronas que lo componen. Uno de los avances más importantes en la investigación sobre las bases de dicha comunicación fue hecha por Hodgkin y Huxley en sus estudios clásicos a principios de la década de 1950, donde por medio de la técnica de registro de fijación de voltaje analizaron la generación y propagación del potencial de acción en el axón gigante de calamar (Hodgkin y Huxley, 1952a, 1952b, 1952c, 1952d). Además, determinaron las principales características funcionales de las corrientes dependientes de voltaje de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. En sus experimentos describieron las conductancias de Na<sup>+</sup> dadas por el canal Nav, las cuales participan en la generación del potencial de acción neuronal (Purves et al., 2004).

#### **8.1.1. Estructura y distribución del canal Nav**

Los canales iónicos forman parte de una gran familia de complejos macromoleculares insertados en la bicapa lipídica de la membrana, cuya función principal es el control del flujo selectivo de moléculas cargadas (iones) a través de dicha membrana. En particular, existe una superfamilia de canales iónicos que abren y cierran poros en respuesta a variaciones pequeñas en el voltaje. Se denominan canales dependientes de voltaje y son los canales de K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (Catterall et al., 2005; Yu y Catterall, 2004). Los canales se denominan en función

de su permeabilidad y selectividad iónica. Las proteínas que conforman el canal de  $\text{Na}^+$  fueron descritas en la década de 1980 (Catterall, 2014).

La proteína que conforma el canal  $\text{Nav}$  fue descubierta por métodos de marcaje con neurotoxinas (Agnew et al., 1980; Beneski y Catterall, 1980). A partir de estos estudios, se demostró que la estructura de dicho canal consiste en una subunidad alfa principal, que está formada por cuatro dominios transmembranales homólogos (I a IV) que se unen por asas extra e intracelulares. Los dominios están compuestos por seis segmentos transmembranales (S1 a S6), donde el S4 actúa como el sensor de voltaje (Payandeh et al., 2011). Estructuralmente, el poro conductor de iones y el filtro de selectividad forman el espacio donde atraviesa el  $\text{Na}^+$ , porción que a su vez se encuentra constituida por el asa entre los segmentos S5 y S6 de cada subunidad, los cuales, constituyen la compuerta de activación que permite la conducción de cationes. Cuando esta compuerta es abierta, permite la entrada de iones de  $\text{Na}^+$  al interior de la célula y fármacos bloqueadores del poro a la cavidad central (Hille, 1977).

En cuanto a los distintos subtipos de canales  $\text{Nav}$ , hasta la fecha se han descrito 9 subtipos, de los cuales el  $\text{Nav}$  1.1,  $\text{Nav}$  1.2,  $\text{Nav}$  1.3 y  $\text{Nav}$  1.6 son expresados principalmente en el SNC. Los canales  $\text{Nav}$  1.1 y  $\text{Nav}$  1.3 se expresan principalmente en el soma neuronal, el canal  $\text{Nav}$  1.2 se encuentra en axones sin mielina y dendritas y el subtipo  $\text{Nav}$  1.6 se encuentra en axones con mielina y dendritas (Catterall, 2012). El canal  $\text{Nav}$  1.4 se expresa principalmente en músculo esquelético, el  $\text{Nav}$  1.5 en el corazón y músculo esquelético, el  $\text{Nav}$  1.7 en SN periférico y los  $\text{Nav}$  1.8 y  $\text{Nav}$  1.9 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Catterall, 2015; Goldin, 1999).

### **8.1.2. Estados funcionales**

El canal  $\text{Nav}$ , tradicionalmente, tiene tres estados funcionales que dependen de cambios conformacionales en la estructura del canal. Particularmente, cuando la



célula se encuentra hiperpolarizada el canal se encuentra cerrado, es decir no conduce iones  $\text{Na}^+$ . Cuando se producen despolarizaciones, el dominio sensor de voltaje o S4, como su nombre lo indica sensa y responde a estos pequeños cambios en el potencial de membrana. Dicha respuesta consiste en un cambio conformacional que permite el estado abierto del canal, estado también denominado de activación (Clairfeuille et al., 2017). La inactivación del canal Nav ocurre en pocos milisegundos posteriores a su apertura. Este es otro de los estados no conductores del canal Nav y se debe al bloqueo de la compuerta del canal por un plegamiento de la asa hacia el interior de la boca del poro, obstruyendo el flujo de  $\text{Na}^+$  (Armstrong y Hille, 1998).

### **8.1.3. Corriente persistente de $\text{Na}^+$**

Además de la activación e inactivación completa rápida de los canales Nav, existe un componente que no se inactiva (Kiss, 2008). Este componente de la corriente de  $\text{Na}^+$  se ha observado en diversas clases de neuronas centrales y es llamada corriente persistente de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{NaP}}$ ) (Crill, 1996) y contribuye a la amplificación de potenciales sinápticos y facilita el disparo repetitivo (Anderson et al., 2014; Vervaeke et al., 2006). Esta corriente, a pesar de ser limitada (1% del total de la corriente de  $\text{Na}^+$ ), es capaz de modular la respuesta neuronal, este cambio puede ser crucial en estados hiperexcitables como es el caso de las crisis epilépticas (Stafstrom, 2007). Es por ello que la  $I_{\text{NaP}}$  se ha propuesto como un blanco de diversos FAEs como la PHT y el riluzol (Niespodziany et al., 2004).

## **8.2. Justificación del experimento**

Los resultados del experimento anterior y la evidencia previa en cardiomiocitos indican que el PPB bloquea corrientes de Nav. Hasta la fecha no se conoce el efecto del PPB en dichas corrientes en neuronas del SNC.

Particularmente, se desconoce el tipo de bloqueo que ejerce el PPB en el canal de  $\text{Na}^+$ , por ejemplo: su posible efecto diferencial en la activación, la inactivación o la recuperación. Tampoco existe información sobre el PPB modificando la corriente persistente de  $\text{Na}^+$ .

### **8.3. Metodología particular**

Los experimentos de este objetivo se realizaron en la modalidad de *voltaje-clamp*, utilizando un LCRA modificado que contenía (en mM): 125 NaCl, 25  $\text{NaHCO}_3$ , 1.25 KCl, 1.25  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5  $\text{MgCl}_2$ , 2.0  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM 4-AP, 20 cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl), 16 D-(+)-Glucosa y 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . Además, se utilizó una solución interna modificada que contenía (en mM): metasulfonato de  $\text{K}^+$ , 135; CsCl, 140;  $\text{MgCl}_2$ , 2; HEPES, 10; EGTA, 10; Mg-ATP, 2; con un pH 7.2 - 7.3 ajustado con CsOH. Se utilizó un método descrito previamente para el registro de corrientes de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ) en neuronas piramidales de la región CA1 en rebanadas de hipocampo (Zhang et al., 2010). Los experimentos de la corriente persistente de  $\text{Na}^+$  se realizaron con las soluciones estándar descritas en las Secciones 5.1 y 5.2.

### **8.4. Resultados**

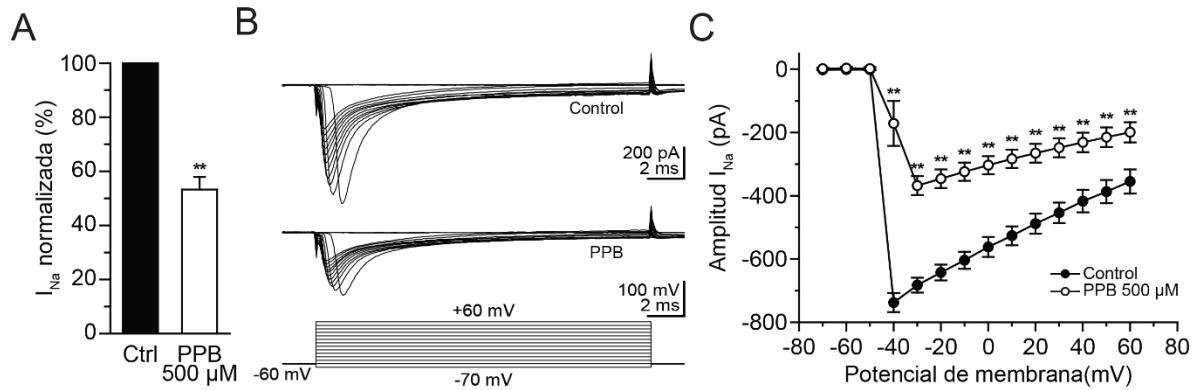
#### **8.4.1. Efecto del PPB en la amplitud de la corriente de $\text{Na}^+$**

Se evaluó el efecto del PPB en la amplitud de la  $I_{\text{Na}}$ , comparando la amplitud de la corriente generada en condiciones control y en la presencia de PPB (500  $\mu\text{M}$ ). Las células registradas se mantuvieron a -70 mV y se les aplicó un pulso de voltaje despolarizante hasta un potencial de +30 mV por 20 ms. Los resultados indicaron que la presencia de PPB disminuyó el 46.8 % de la amplitud normalizada ( $p < 0.01$ ), como se muestra en la Figura 20 (Panel A). Posteriormente, se realizó una curva

corriente-voltaje con el siguiente protocolo: las células se fijaron a -80 mV y la  $I_{Na}$  fue generada por la aplicación de pulsos de -70 a +60 mV en incrementos de 10 mV por 20 ms. El análisis de resultados mostró que el PPB indujo una reducción significativa en las amplitudes máximas desde el voltaje de -40 al de +60 mV ( $p < 0.001$ ), como se muestra en la Figura 20 (Paneles A y C) ( $n = 9$ ).

#### **8.4.2. Efecto del PPB en estado de activación del canal**

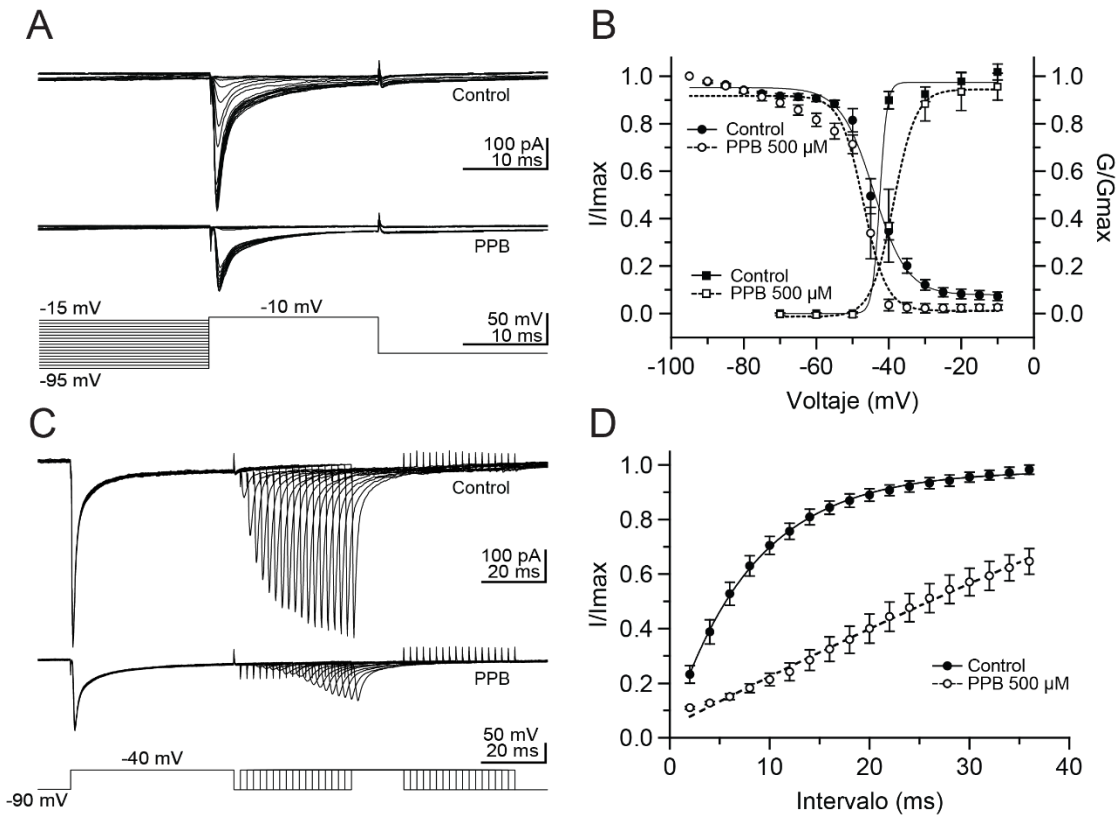
Para explorar si el PPB modifica el estado de activación del canal, se fijó a las células a -70 y se aplicaron pulsos despolarizantes de -70 to +40 mV (por 20 ms). Las amplitudes fueron convertidas a conductancia ( $G$ ) y la conductancia pico ( $G_{max}$ ) se graficó contra cada potencial de prueba. Las curvas generadas se ajustaron a la ecuación de Boltzmann (control  $r^2 = 0.9729$  y PPB  $r^2 = 0.8088$ ). El análisis de los resultados arrojó lo siguiente: para el potencial al cual se alcanza el 50 % de activación en condiciones control fue de  $-42.58 \pm 9.7$  mV y en presencia de PPB fue de  $-38.74 \pm 1.1$  mV (n.s.;  $p > 0.05$ ). Estos resultados indican que el PPB no tiene efecto significativo en la dependencia del voltaje de la activación, aunque hay que tomar en cuenta la varianza en los datos, como se observa en la Figura 21 (Panel B).



**Figura 20. Efecto del PPB en la corriente de  $Na^+$ .** **A)** Ejemplo típico de la corriente generada en respuesta a la aplicación de pulsos cuadrados de voltaje en condiciones control (trazo superior) y posterior a la aplicación de PPB 500  $\mu$ M (trazo inferior). **B)** Corriente de  $Na^+$  normalizada donde se aprecia la disminución significativa de la corriente entrante producida por la aplicación de PPB. **C)** Curva corriente-voltaje en condiciones control (círculos cerrados) y en presencia de PPB (círculos abiertos). \*\*  $p < 0.01$ , contra el control,  $n = 9$ .

#### 8.4.3. Efecto del PPB en el estado de inactivación del canal

La inactivación del canal se midió fijado a las células a -70 mV y aplicando un protocolo de doble pulso, el primero para inactivar los canales y el segundo para cuantificar la fracción de canales que no fueron inactivados por el primero, como se observa en la Figura 21 (Panel A). Se graficaron los valores normalizados en función del prepulso condicionante y se ajustaron a la ecuación de Boltzmann (control  $r^2 = 0.95$  y PPB  $r^2 = 0.91$ ). El voltaje al cual el 50 % de la fracción de canales se encuentra disponible en condiciones control fue  $-44.2 \pm 0.4$  mV y el PPB provocó un corrimiento hacia valores hiperpolarizados, colocando el valor en  $-47.01 \pm 0.4$  mV, como se puede observar en la Figura 21 (Panel B) ( $p < 0.01$ ).



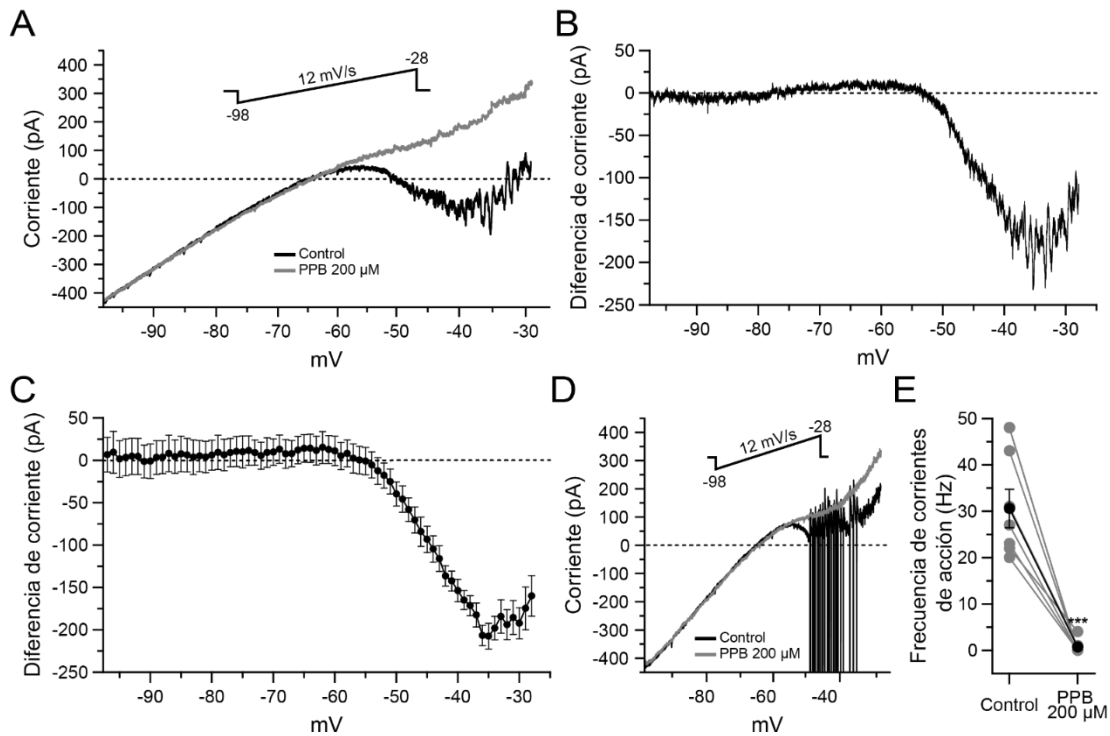
**Figura 21. Efecto del PPB en la activación, inactivación y recuperación del canal  $Na_v$ .** **A)** Trazos de corriente representativos de la cinética de inactivación en condiciones control (trazo superior) y en presencia de PPB (trazo inferior). **B)** Gráfica de dispersión que muestra la amplitud corriente pico normalizada (eje izquierdo; círculos) y la conductancia máxima normalizada (eje derecho; cuadrados). Cada punto en la gráfica corresponde la media y E.E. y fueron adquiridos en el potencial de mantenimiento (eje horizontal). **C)** Trazos de corriente representativos de la recuperación de la inactivación del canal. Dichos trazos fueron obtenidos por un protocolo de doble pulso variando del intervalo del segundo pulso. **D)** Gráfica que resume la curva de tiempo de recuperación de la corriente de  $Na^+$  en condiciones control (círculos cerrados) y en presencia de PPB (círculos abiertos). Nótese que el PPB indujo un marcado enlentecimiento de la recuperación de la inactivación del canal ( $n = 9$ ).

#### **8.4.4. Efecto del PPB en la recuperación de la inactivación**

También, se midió el efecto del PPB en la recuperación de la inactivación del canal. Para ello, se aplicaron dos pulsos de igual magnitud donde se varía el tiempo entre los ambos (2 - 36 ms en incrementos de 2 ms). Un ejemplo del protocolo utilizado y los trazos generados en respuesta al mismo se puede ver en la Figura 21 (Panel C). En condiciones control, la recuperación total de la inactivación tuvo una duración de 28.4 ms en promedio, el PPB indujo un retardo en la recuperación causando que a los 36 ms sólo el 60 % de los canales se encontraran disponibles como se puede observar en la Figura 21 (Panel D).

#### **8.4.5. Efecto del PPB sobre la corriente persistente de Na<sup>+</sup>**

Finalmente, medimos el efecto del PPB sobre la corriente persistente de Na<sup>+</sup> ( $I_{NaP}$ ). Esta corriente se produce experimentalmente inyectando rampas lentas de voltaje y es detectada como una corriente entrante que ocurre aproximadamente a 10 mV positivos del PMR. Para esta serie de experimentos se realizó el siguiente protocolo de estimulación: fijando las células a -65 mV y aplicando una rampa lenta de voltaje (20 mV/s) de -98 a -28 mV, para generar la corriente de Na<sup>+</sup> persistente ( $I_{NaP}$ ) (Yamada-Hanff y Bean, 2013). La rampa de voltaje reveló una corriente entrante alrededor de los -60 mV, dicha corriente alcanzó un pico máximo de  $-110.4 \pm 7.5$  pA (cercano a -40 mV), como se observa en la Figura 22 (Panel A). Cuando el PPB (200  $\mu$ M) fue aplicado, se observó que la corriente entrante fue eliminada y se convirtió lineal, alcanzando un valor de  $101.1 \pm 23.8$  pA a -45 mV, trazo gris en el Panel A ( $n = 7$ ;  $p < 0.001$ ). Además, la rampa lenta de voltaje provocó corrientes de acción en un grupo de neuronas ( $n = 7$ ), las cuales fueron suprimidas por la aplicación de PPB 200  $\mu$ M, como se observa en la Figura 22 (Paneles D y E) ( $p < 0.001$ ).



**Figura 22. Efecto del PPB en la  $I_{NaP}$ .** **A)** Ejemplo típico de la corriente generada en respuesta a la aplicación de una rampa lenta de voltaje (20 mV/s; de -98 a -28 mV) en condiciones control (trazo negro) y posterior a la aplicación de PPB 200  $\mu$ M (trazo gris). Se aprecia la disminución producida por la aplicación de PPB de la corriente entrante. **B-C)** Diferencia aritmética de corriente de **(A)** y promedio de la diferencia de corriente de todas las neuronas registradas **(C)**. **D)** Trazo representativo de las corrientes de acción producidas por la rampa lenta de voltaje en condiciones control (trazo negro) y durante la aplicación de PPB. Nótese que el PPB abolió las corrientes de acción. **E)** Promedio de la frecuencia de corrientes de acción (círculos cerrados) y por neuronal individual (círculos grises) en condiciones control y durante la aplicación de PPB. \*\*\*  $p < 0.001$ , contra el control,  $n = 9$ .

## 8.5. Discusión

En este último grupo de experimentos se demostró que el PPB bloquea las corrientes de Na<sup>+</sup> de inactivación rápida en neuronas piramidales. Nuestros resultados corroboran las predicciones computacionales del efecto anticonvulsivo del PPB (Talevi et al., 2007) y respaldan el efecto atenuador de la actividad convulsiva encontrado en experimentos *in vivo* (Santana-Gómez et al., 2017). Además, coincide con la demostración de que algunos parabenos modulan canales iónicos (Inoue et al., 1994), y en particular el PPB inhibe canales de Na<sup>+</sup> en cardiomiocitos aislados (Ji et al., 2004).

El PPB ejerce un efecto de reducción de la excitabilidad neuronal similar al producido por FAEs y anestésicos locales. Dicho efecto es el enlentecimiento de la recuperación de la inactivación del canal y con ello la uso-dependencia (Hille, 1977). Se ha demostrado que la PHT, LTG y CBZ comparten este mecanismo de acción (Colombo et al., 2013; Kuo, 1998; Lang et al., 1993; Willow et al., 1985). Mecanismo que ha sido propuesto como el responsable del efecto anticonvulsivo de diversos FAEs (Rogawski y Löscher, 2004). Lo anterior explica el efecto atenuador de la actividad convulsiva observado *in vivo* y también podría explicar la ausencia de efecto cuando se combina PPB con otros FAEs cuyo mecanismo de acción también es el bloqueo de canales de Nav. Lo anterior debido a que se ha propuesto una mayor efectividad al combinar FAEs con distinto mecanismo de acción ya que no compiten por el mismo sitio de acción y/o sus efectos son mayores al tener acciones en otros blancos terapéuticos (Deckers et al., 2000).

Las concentraciones más altas probadas en este experimento ejercieron un bloqueo tónico, reduciendo la amplitud de la corriente de Na<sup>+</sup> (Ragsdale et al., 1991), lo cual puede explicar la supresión del disparo neuronal. Además, las concentraciones intermedias provocaron un bloqueo uso-dependiente, de esta manera restringiendo los canales disponibles (prolongando el periodo refractario) para el disparo repetitivo (Courtney, 1975; Hille, 1977). Resultados que también



explican los cambios progresivos en los PAs consecutivos observados en el experimento previo (ver Sección 7.4.2.5).

El efecto en la  $I_{NaP}$  indica que el PPB también disminuye la excitabilidad neuronal reduciendo la amplitud de esta corriente entrante. Este efecto puede explicar la disminución de la frecuencia de disparo en respuesta a la inyección de corriente y, de igual importancia, la supresión de la actividad epileptiforme. Además, el PPB comparte con el riluzol (fármaco neuroprotector y bloqueador específico de la  $I_{NaP}$ ) este mecanismo de acción, resultado que puede explicar el efecto neuroprotector encontrado *in vivo* (Santana-Gómez et al., 2017).

El efecto del PPB en la transición del canal de inactivo a recuperado, es similar a que ejerce la PHT. Esto sugiere que el PPB podría inducir un cambio conformacional en el canal que interfiere con la partícula de inactivación, minimizando la entrada de  $Na^+$  (Kuo y Bean, 1994); o alterando el movimiento del sensor de voltaje, lo que afecta el desarrollo de la recuperación del estado inactivo (Capes et al., 2013).

## 9. Discusión y conclusiones generales

En el presente estudio se demostró que un parabeno induce un efecto relevante en el SNC de mamíferos en un modelo *in vitro*. Dicho efecto se observó en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas. Los resultados demuestran que el PPB: 1) suprime la actividad epileptiforme y reduce la actividad sináptica; 2) limita el DRS y disminuye la excitabilidad intrínseca; 3) bloquea el canal de Na<sup>+</sup>, facilitando el estado inactivo y retardando la recuperación del estado inactivado.

La epilepsia es un trastorno neurológico que se caracteriza por hipersincronización de poblaciones neuronales como resultado de un desequilibrio entre la inhibición y la excitabilidad (McCormick y Contreras, 2001). La mayoría de los FAEs convencionales reducen dicho desequilibrio (Loscher et al., 2013). En ese sentido, la aplicación de PPB suprime la actividad epileptiforme y disminuye la actividad sináptica espontánea en el modelo *in vitro*, lo que puede explicar las evidencias previas descritas *in vivo*, donde el PPB indujo una disminución de la excitabilidad hipocampal (Santana-Gómez et al., 2017).

Los resultados obtenidos en el Experimento 1 (Capítulo 6) mostraron que el PPB disminuyó significativamente el número de PAs hasta su supresión total a la concentración de 500  $\mu$ M. Adicionalmente, se mostró que el efecto del PPB es reversible, lo cual indica que la inhibición de la actividad epileptiforme inducida por este fármaco no es consecuencia de efectos tóxicos en las neuronas piramidales, a las concentraciones y tiempo probados en este experimento.

El efecto inhibitorio en la actividad epileptiforme inducido por el PPB, también podría deberse a sus efectos en blancos terapéuticos diversos. Uno de los blancos podría ser el receptor a estrógenos, ya que se ha demostrado que el PPB actúa en ellos con baja afinidad (Routledge et al., 1998). Se sabe que los estrógenos pueden modificar la excitabilidad intrínseca neuronal (Woolley, 2007) y suprimir la actividad epileptiforme en cultivos neuronales pretratados con 17 $\beta$ -estradiol (Zhang et al., 2015). Aunque existen reportes indicando que el 17 $\beta$ -estradiol incrementa la

excitabilidad de neuronas del núcleo preóptico (Zhang et al., 2015), efecto contrario al encontrado en el presente estudio.

Por otra parte, la disminución de los EPSPs durante la actividad epileptiforme sugiere que el PPB ejerce un efecto presináptico, reduciendo la probabilidad de liberación de neurotransmisores en sinapsis excitatorias, y contribuyendo a la disminución de la excitabilidad neuronal (Yonekawa et al., 1995). Esta idea es apoyada por experimentos *in vivo* realizados en el laboratorio que indican que la administración de PPB revierte el incremento en la liberación de glutamato en el hipocampo de ratas durante el SE inducido por litio-pilocarpina (Santana-Gómez et al., 2017).

Estudios previos indican que la PHT no es capaz de suprimir la actividad epileptiforme (Brückner et al., 1999; Brückner y Heinemann, 2000; D'Antuono et al., 2010) y el PPB tuvo un efecto mayor. Lo anterior permite sugerir que, en comparación a la PHT, el PPB es más eficaz en reducir la actividad epileptiforme inducida por 4-AP *in vitro*. Es importante mencionar que la concentración de PHT utilizada en el presente estudio, equivale a la concentración terapéutica reportada en LCR y tejido cerebral (Köhling, 2002). Adicionalmente, la baja solubilidad de la PHT dificulta la aplicación de concentraciones más altas, por lo que no fueron probadas.

Por otro lado, se sabe que el PPB se encuentra en los excipientes de diversos fármacos relevantes (Gelb et al., 1992; Kitamura, 1979), incluyendo drogas antiepilépticas como CBZ, Levetiracetam, Oxcarbazepina, Pregabalina, Rufinamida y Valproato de Sodio (EU Pharmaceutical Informations, 2015; European Medicines Agency, 2014; Novartis, 2010, 2016; Sanofi, 2013). Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible que la presencia de PPB en preparaciones comerciales de ciertos fármacos antiepilépticos aumente el efecto de éstos últimos. Por lo anterior, se considera importante realizar estudios adicionales para comprobar esta idea y diseñar combinaciones terapéuticas que induzcan efectos antiepilépticos más efectivos y con menos efectos adversos.

Tomando en cuenta que el PPB suprimió la actividad epileptiforme producto de la aplicación de 4-AP, en el Experimento 2 (Capítulo 7) de este trabajo se determinó el efecto del PPB en el DRS y la excitabilidad intrínseca. Como se conoce, las neuronas piramidales emiten PAs en respuesta a la inyección somática de corriente. La aplicación de PPB indujo un aumento en la cantidad de corriente necesaria para producir PAs, efecto que confirma el aumento en el umbral post-descarga observado *in vivo* (Santana-Gómez et al., 2017). Además, a mayor cantidad de corriente inyectada existe un aumento de la frecuencia de disparo, en cambio, la aplicación de PPB provocó una reducción significativa de este parámetro. En el mismo sentido, nuestros resultados indicaron que al igual que otros fármacos antiepilépticos y anestésicos locales con diferente mecanismo de acción (Macdonald, 1988; McLean y Macdonald, 1988; Schwarz y Puil, 1998), el PPB también es efectivo para limitar el DRS. Este resultado explica la reducción progresiva del número de PAs observada durante la actividad epileptiforme. Conjuntamente, la reducción de la excitabilidad intrínseca contribuye significativamente a la disminución en la sobre-excitabilidad del hipocampo. En particular, se sabe que esta estructura cumple un papel importante en la patogénesis de la epilepsia, ya que las crisis tienden a originarse en ella para propagarse a otras estructuras cerebrales (Quesney, 1986; Rutecki et al., 1989). Es posible inferir que la aplicación de PPB, al inhibir los disparos neuronales, limita la propagación de la actividad a otras regiones cerebrales. De igual importancia, la excitabilidad intrínseca neuronal influye en la transformación de estímulos subumbral en PAs y la aplicación de PPB limita las despolarizaciones membranales que favorecen la apertura de canales dependientes de voltaje, que, a su vez contribuyen a la muerte neuronal por excitotoxicidad (Dougherty et al., 2012). Por esta razón, el PPB tiene un efecto neuroprotector en modelos *in vivo*. Otra evidencia que apoya los resultados encontrados *in vivo* encontrados en el laboratorio (Santana-Gómez et al., 2017), es la reducción significativa del número y amplitud de EPSPs producida por el PPB durante la actividad epileptiforme. Lo anterior indica que es capaz de estabilizar la membrana presináptica, previniendo la liberación de

neurotransmisores excitatorios, particularmente el glutamato. Efecto que comparte con FAEs de uso común (Upton, 1994).

Por otra parte, encontramos que el PPB también afecta la dinámica de los PAs individuales. Los efectos se asemejan a los producidos por fármacos bloqueadores del canal de Na<sup>+</sup> como la TTX (Naundorf et al., 2006), PHT (McLean y Macdonald, 1983), Lidocaína (Schwarz y Puil, 1998), CBZ (McLean y Macdonald, 1986a). En este sentido, encontramos cambios por el PPB principalmente en la  $V_{max}$  del PA, este parámetro es utilizado como indicador de la entrada de Na<sup>+</sup> (Capek y Esplin, 1994; McLean y Macdonald, 1986b; Strichartz y Cohen, 1978). Además, los cambios en los PAs sucesivos indican un bloqueo uso-dependiente, esto es evidente al comparar la  $V_{max}$  del primer potencial de acción con el segundo y el tercero, etc. Estos cambios indican que existe una disminución progresiva de los canales de Na<sup>+</sup> disponibles para cada PA sucesivo (uso-dependencia). El aumento en el umbral de disparo y la disminución de la amplitud de los PAs sucesivos en presencia de PPB también apoyan esta idea (Figura 18).

Al aplicar intracelularmente el PPB, no se observó la reducción en la excitabilidad que se induce cuando se aplica el compuesto en el lado extracelular. Esta característica es compartida con fármacos antiepilépticos usados comúnmente como la PHT, LTG (Kuo, 1998) y CBZ (Jo y Bean, 2014). Adicionalmente, las neuronas a las que se les aplicó el PPB intracelular, permanecieron vivas y sin cambios asociados a degeneración celular por más de 40 min de registro. Este resultado muestra que el fármaco no produjo toxicidad, aun aplicando intracelularmente a una concentración de 200  $\mu$ M. Esta ausencia de efecto es importante, ya que revela que el PPB no produce la disminución en la excitabilidad por una interacción con componentes citoplasmáticos de las neuronas registradas (al menos por la exposición aguda). Para corroborar el efecto extracelular, se perfundió PPB extracelularmente a las mismas neuronas y se observó el efecto característico previamente descrito.

Los resultados previos sugieren un bloqueo de canal de Na<sup>+</sup>, este efecto ha sido descrito anteriormente en cardiomiocitos (Ji et al., 2004). Por ello, se realizó el

Experimento 3 (Capítulo 8) donde se determinó el efecto del PPB en las corrientes de  $\text{Na}^+$  en neuronas piramidales. Los resultados demostraron que el PPB a altas concentraciones (500 y 1000  $\mu\text{M}$ ) bloquea tónicamente el canal de  $\text{Na}^+$ , lo que podría disminuir en gran medida la amplitud de la corriente entrante necesaria para la generación de PAs. Este hecho explica la supresión de la actividad epileptiforme y la abolición de los PAs en respuesta a inyecciones de corriente de más de 700 pA (Figura 8 y Figura 13, respectivamente). También se encontró que el PPB facilita la inactivación del canal, aumentando la fracción de canales inactivos en potenciales más hiperpolarizados (Figura 21). Cuando la neurona emite un PA, la facilitación de la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  dependiente de voltaje provocada por el PPB reduce la cantidad de canales disponibles para el siguiente PA. Factor que explica el aumento de la corriente rebase y el aumento en el umbral de disparo. Al analizar las corrientes de ventana, se hace evidente que la aplicación de PPB reduce en un 75 % la fracción de canales disponibles. Finalmente, el efecto más prominente del PPB fue un retardo significativo en la recuperación de la inactivación del canal, enlenteciendo la transición del estado inactivo al estado disponible para su apertura. El mecanismo propuesto es el siguiente: cuando la neurona emite un PA, el PPB enlentece el proceso de recuperación de la inactivación, provocando una reducción de la fracción de canales disponibles para el siguiente PA, factor que explica el efecto uso-dependiente del PPB. Dicho efecto modifica principalmente los PAs consecutivos, hasta que el efecto es tal que la neurona deja de emitir PAs debido a que la neurona permanece en estado refractario. Como puede inferirse, este efecto explica la reducción de la frecuencia de disparo encontrada en el Experimento 2.

Por otro lado, está permitido el uso de 0.1 % de PPB en distintas preparaciones farmacéuticas administradas por vía oral o piel (Sasseville, 2004; Soni et al., 2001), de hecho, esta concentración equivale a 5.55 mM. La concentración máxima que utilizamos para el presente estudio fue de 1 mM (5 veces menor), la cual abolió totalmente el disparo neuronal; de la misma manera, la concentración de 500  $\mu\text{M}$  suprimió la actividad epileptiforme. La concentración de exposición máxima en humanos es 5 veces mayor a la que se utilizó en el presente trabajo. Por estas razones, las concentraciones empleadas en este estudio son

relevantes. Sin embargo, en el presente estudio no se probó la concentración de 5 mM, pero es posible que el efecto de 5 mM sea todavía mayor y/o tenga efecto en otros canales u otros blancos celulares (sin descartar su posible efecto tóxico). De igual importancia, se sabe que la exposición a PPB en humanos es considerable, ya que se puede encontrar como conservador en una amplia variedad de productos; además, su producción generalizada hace que se pueda encontrar presente en aguas superficiales, suelo y algunas especies de peces (Błądzka et al., 2014; Olmo et al., 2015; Tavares et al., 2009). Por lo anterior, es necesario tomar en cuenta la sumatoria de la exposición a este compuesto en alimentos, medicamentos, artículos de tocador, etc., lo que puede provocar concentraciones altas en humanos. Especialmente, hay que tomar en cuenta la presencia de PPB como conservador en preparaciones comerciales de FAEs y sumar la exposición al compuesto en otros productos y el ambiente.

En el presente estudio se describieron los efectos electrofisiológicos, en neuronas piramidales, de un compuesto con potencial anticonvulsivo. Los resultados demuestran que la aplicación de PPB tiene efectos inhibidores de la excitabilidad neuronal, respaldando dicho potencial anticonvulsivo. Las técnicas computacionales ofrecen rapidez y economía para proponer fármacos con potencial. Sin embargo, es necesario probar dichos fármacos en sistemas biológicos y en diferentes modelos. Al probar los efectos electrofisiológicos de dichos compuestos, podemos corroborar su efecto de manera directa y con modelos establecidos, ahorrando años de investigación y recursos. Además, este compuesto se encuentra aprobado por la FDA, con ello en cuenta, es posible diseñar combinaciones de fármacos anticonvulsivos y PPB que aumenten su eficacia y disminuyan sus efectos secundarios. La mayoría de los pacientes con epilepsia obtienen control satisfactorio de sus crisis con el tratamiento de FAEs convencional, sin embargo, alrededor del 30 - 40 % de ellos manifiesta farmacoresistencia. Es por ello que es necesario el desarrollo de nuevos fármacos que contribuyan al tratamiento efectivo. Por ello, los resultados del presente estudio apoyan el uso potencial del PPB como fármaco anticonvulsivante.

## 10. PERSPECTIVAS

En este estudio demostramos que el PPB bloquea corrientes de Na<sup>+</sup> en neuronas, sin embargo, es necesario estudiar el efecto de diferentes concentraciones en otros canales y otros blancos celulares. Del mismo modo, proponemos comprobar si el PPB es efectivo para suprimir la actividad epileptiforme *in vitro* inducida por otros modelos (por ejemplo, animales epilépticos, modelo de pilocarpina, bloqueo GABAérgico, etc.), ya que cada modelo tiene características propias complementarias. Asimismo, consideramos conveniente estudiar la efectividad de diversos FAEs suprimiendo la actividad epileptiforme en comparación con la del PPB.

Nuestros resultados demuestran que la disminución en la excitabilidad producida por el PPB, no es intracelular. Por lo anterior, proponemos hacer estudios de *docking* con el canal de Na<sup>+</sup>, para distinguir el sitio posible de interacción del PPB. Además, se puede aplicar junto con otros bloqueadores de canal de Na<sup>+</sup> y determinar si compite por el mismo sitio de acción o su efecto es aditivo.

Otra de las perspectivas que este trabajo abre, es la de estudiar el efecto del PPB en la liberación de glutamato y GABA. Con ello determinar si tiene un efecto pre o post-sináptico. Adicionalmente, evaluar el efecto del compuesto en las distintas poblaciones de neuronas en el hipocampo (interneuronas, neuronas granulares del GD, neuronas piramidales de CA3, etc.), ya que cada tipo neuronal juega un papel distinto, tanto en el procesamiento y transmisión de la información, como en la fisiopatología de la epilepsia.

Debido a que se hicieron registros de neuronas individuales, es necesario evaluar el efecto de esta molécula en poblaciones neuronales (registros de campo en rebanadas), en LCRa normal y durante la inducción de actividad epileptiforme. La información obtenida confirmará el potencial anticonvulsivo del PPB a nivel del circuito hipocampal. Esta aproximación, adicionalmente permite registros de varias horas, lo que es de especial importancia para evaluar el efecto a un plazo de mayor duración que el utilizado en el presente estudio.



Finalmente, proponemos caracterizar las concentraciones cerebrales del PPB después de ser administrado a través de diferentes vías sistémicas, información que no existe hasta el momento. Esto nos permitiría definir con precisión el efecto inhibitorio directo en el SN dependiendo de la dosis administrada, y con ello, definir dosis terapéuticas efectivas.

Ya que el bloqueo de canales de Na<sup>+</sup> es un mecanismo de acción compartido por diversos fármacos, como los anestésicos locales, los antiarrítmicos y anticonvulsivos, sería pertinente evaluar su uso potencial para cada caso particular.

## 11. REFERENCIAS

- Aalto, T., Firman, M. y Rigler, N. (1953). p-hydroxybenzoic acid esters as preservatives. I. Uses, antibacterial and antifungal studies, properties and determination. *Journal of the American Pharmacists Association*, 449–457. doi:10.1002/jps.3030420802
- Adams, B. E. L., Reid, C. A., Myers, D., Ng, C., Powell, K., Phillips, A. M., ... Williams, D. A. (2009). Excitotoxic-mediated transcriptional decreases in HCN2 channel function increase network excitability in CA1. *Experimental Neurology*, 219(1), 249–257. doi:10.1016/j.expneurol.2009.05.030
- Agnew, W. S., Moore, A. C., Levinson, S. R. y Raftery, M. A. (1980). Identification of a large molecular weight peptide associated with a tetrodotoxin binding protein from the electroplax of *Electrophorus electricus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 92(3), 860–866. doi:10.1016/0006-291X(80)90782-2
- Albertson, A. J., Williams, S. B. y Hablitz, J. J. (2013). Regulation of epileptiform discharges in rat neocortex by HCN channels. *Journal of Neurophysiology*, 110(8), 1733–43. doi:10.1152/jn.00955.2012
- Andersen, F. A. (2008). Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. *International Journal of Toxicology*, 27, 1–82. doi:10.1080/10915810802548359
- Anderson, L. L., Thompson, C. H., Hawkins, N. A., Nath, R. D., Petersohn, A. A., Rajamani, S., ... George, A. L. (2014). Antiepileptic activity of preferential inhibitors of persistent sodium current. *Epilepsia*, 55(8), 1274–1283. doi:10.1111/epi.12657
- Armstrong, C. M. y Hille, B. (1998). Voltage-Gated Ion Channels and Electrical Excitability. *Neuron*, 20(3), 371–380. doi:10.1016/S0896-6273(00)80981-2
- Avoli, M., D'Antuono, M., Louvel, J., Köhling, R., Biagini, G., Pumain, R., ... Tancredi, V. (2002). Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Progress in Neurobiology*, 68(3), 167–207. doi:10.1016/S0301-0082(02)00077-1
- Avoli, M., De Curtis, M., Gnatkovsky, V., Gotman, J., Köhling, R., Lévesque, M., ... Williams, S. (2016). Specific imbalance of excitatory/inhibitory signaling establishes seizure onset pattern in temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurophysiology*, 2015, jn.01128.2015. doi:10.1152/jn.01128.2015
- Avoli, M. y Jefferys, J. G. R. (2016). Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. *Journal of Neuroscience Methods*, 260, 26–32. doi:10.1016/j.jneumeth.2015.10.006
- Ayala, G. F., Johnston, D., Lin, S. y Dichter, H. N. (1977). The mechanism of action of diphenylhydantoin on invertebrate neurons. II. Effects on synaptic mechanisms. *Brain Research*, 121(2), 259–270. doi:10.1016/0006-8993(77)90151-2
- Baardseth, P. y Russwurm, H. (1978). Content of some organic acids in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.). *Food Chemistry*, 3(1), 43–46. doi:10.1016/0308-8146(78)90046-8

- Barr, L., Metaxas, G., Harbach, C. A. J., Savoy, L. A. y Darbre, P. D. (2012). Measurement of parabens concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *Journal of Applied Toxicology*, 32(3), 219–232. doi:10.1002/jat.1786
- Bean, B. P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 451–465. doi:10.1038/nrn2148
- Beneski, D. A. y Catterall, W. A. (1980). Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(1), 639–643. doi:10.1073/pnas.77.1.639
- Bernard, C. (2006). Hippocampal Slices: Designing and Interpreting Studies in Epilepsy Research. In *Models of Seizures and Epilepsy* (pp. 59–72). doi:10.1016/B978-012088554-1/50008-6
- Bishop, P. O., Jeremy, D. y Mcleod, J. G. (1953). Phenomenon of repetitive firing in lateral geniculate of cat. *Journal of Neurophysiology*, 16(4), 437–47.
- Błędzka, D., Gromadzińska, J. y Wąsowicz, W. (2014). Parabens. From environmental studies to human health. *Environment International*, 67, 27–42. doi:10.1016/j.envint.2014.02.007
- Block, S. S. (2001). *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Lippincott Williams y Wilkins.
- Boberg, J., Taxvig, C., Christiansen, S. y Hass, U. (2010). Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reproductive Toxicology*, 30(2), 301–312. doi:10.1016/j.reprotox.2010.03.011
- Bredin, J., Davin-Régli, A. y Pagès, J.-M. (2005). Propyl paraben induces potassium efflux in Escherichia coli. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(6), 1013–5. doi:10.1093/jac/dki110
- Brodie, M. J. y Sills, G. J. (2011). Combining antiepileptic drugs - Rational polytherapy? *Seizure*, 20(5), 369–375. doi:10.1016/j.seizure.2011.01.004
- Browne, T. R. y Holmes, G. L. (2001). Epilepsy. *New England Journal of Medicine*, 344(15), 1145–1151. doi:10.1056/NEJM200104123441507
- Brückner, C. y Heinemann, U. (2000). Effects of standard anticonvulsant drugs on different patterns of epileptiform discharges induced by 4-aminopyridine in combined entorhinal cortex-hippocampal slices. *Brain Research*, 859(1), 15–20. doi:10.1016/S0006-8993(99)02348-3
- Brückner, C., Stenkamp, K., Meierkord, H. y Heinemann, U. (1999). Epileptiform discharges induced by combined application of bicuculline and 4-aminopyridine are resistant to standard anticonvulsants in slices of rats. *Neuroscience Letters*, 268(3), 163–165. doi:10.1016/S0304-3940(99)00341-9
- Buckle, P. J. y Haas, H. L. (1982). Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *The Journal of Physiology*, 326(1), 109–122. doi:10.1113/jphysiol.1982.sp014180
- Capek, R. y Esplin, B. (1994). Effects of lidocaine on hippocampal pyramidal cells: depression of repetitive firing. *Neuroreport*, 5(6), 681–684.

- Capes, D. L., Goldschen-Ohm, M. P., Arcisio-Miranda, M., Bezanilla, F. y Chanda, B. (2013). Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels. *The Journal of General Physiology*, 142(2), 101–12. doi:10.1085/jgp.201310998
- Cashman, A. L. y Warshaw, E. M. (2005). Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis*.
- Catterall, W. A. (2012). *Sodium Channel Mutations and Epilepsy. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (Vol. 55).
- Catterall, W. A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental Physiology*, 99(1), 35–51. doi:10.1113/expphysiol.2013.071969
- Catterall, W. A. (2015). CHAPTER 5. Voltage-gated Sodium Channels: Structure, Function, and Molecular Pharmacology (pp. 83–104). doi:10.1039/9781849735087-00083
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V. yu, F. H., Konoki, K. y Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49(2), 124–141. doi:10.1016/j.toxicon.2006.09.022
- Catterall, W. A., Goldin, A. L. y Waxman, S. G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 397–409. doi:10.1124/pr.57.4.4.and
- Chen, J., Ahn, K. C., Gee, N. A., Gee, S. J., Hammock, B. D. y Lasley, B. L. (2007). Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(3), 278–284. doi:10.1016/j.taap.2007.03.015
- Chirawut, B. (2005). *Antifungal compounds and mechanism of resistance of mango peel against Colletotrichum gloeosporioides. Doctor of Philosophy Thesis*.
- Clairfeuille, T., Xu, H., Koth, C. M. y Payandeh, J. (2017). Voltage-gated sodium channels viewed through a structural biology lens. *Current Opinion in Structural Biology*, 45, 74–84. doi:10.1016/j.sbi.2016.11.022
- Cloues, R. K. y Sather, W. a. (2003). Afterhyperpolarization regulates firing rate in neurons of the suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(5), 1593–604.
- Colombo, E., Franceschetti, S., Avanzini, G. y Mantegazza, M. (2013). Phenytoin Inhibits the Persistent Sodium Current in Neocortical Neurons by Modifying Its Inactivation Properties. *PLoS ONE*, 8(1). doi:10.1371/journal.pone.0055329
- Courtney, K. R. (1975). Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 195(2), 225–36.
- Crill, W. E. (1996). Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annual Review of Physiology*, 58(31), 349–362. doi:10.1146/annurev.physiol.58.1.349
- D'Antuono, M., Köhling, R., Ricalzone, S., Gotman, J., Biagini, G. y Avoli, M. (2010).

- Antiepileptic drugs abolish ictal but not interictal epileptiform discharges in vitro. *Epilepsia*, 51(3), 423–431. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02273.x
- Darbre, P. D., Aljarrah, a., Miller, W. R., Coldham, N. G., Sauer, M. J. y Pope, G. S. (2004). Concentrations of Parabens in human breast tumours. *Journal of Applied Toxicology*, 24(1), 5–13. doi:10.1002/jat.958
- David, R. M., Bachman, A. N., Butala, J. H., Piper, J. T. y Shelp, C. J. (2012). Esters of Mono-, Di-, and Tricarboxylic Acids. In *Patty's Toxicology* (Vol. 4, pp. 147–352). Hoboken, NJ, USA: John Wiley y Sons, Inc. doi:10.1002/0471435139.tox080.pub2
- Deckers, C. L., Czuczwar, S. J., Hekster, Y. A., Keyser, A., Kubova, H., Meinardi, H., ... Van Rijn, C. M. (2000). Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanisms of action: the evidence reviewed. *Epilepsia*, 41(11), 1364–1374.
- Diao, L., Hellier, J. L., Uskert-Newsom, J., Williams, P. A., Staley, K. J. y Yee, A. S. (2013). Diphenytoin, riluzole and lidocaine: Three sodium channel blockers, with different mechanisms of action, decrease hippocampal epileptiform activity. *Neuropharmacology*, 73, 48–55. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.057
- Dougherty, K. A., Islam, T. y Johnston, D. (2012). Intrinsic excitability of CA1 pyramidal neurones from the rat dorsal and ventral hippocampus. *J Physiol*, 590(22), 5707–5722. doi:10.1113/jphysiol.2012.242693
- EFSA. (2004). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to para hydroxybenzoates (E 214-219). *EFSA Journal*, 2(9), 1–44. doi:10.2903/j.efsa.2004.83
- El Aissami, A., El Amri, H., Mrabet, N., Chekti, R. y Lahlou, H. (1998). Contribution to the study of the chemical composition of *Verticillium albo-atrum* secretions in liquid media. *Mycopathologia*, 144(2), 93–95. doi:10.1023/A:1007092620222
- Elharrar, V. (1988). Recovery from use-dependent block of Vmax and restitution of action potential duration in canine cardiac Purkinje fibers. *Journal of Pharmacology and Experimental ...*, 246(1), 235–242.
- Engel, J. y Schwartzkroin, P. A. (2006). What Should Be Modeled? In *Models of Seizures and Epilepsy* (pp. 1–14). doi:10.1016/B978-012088554-1/50003-7
- Enrique, A., Zavala-Tecuapetla, C., Luna-Munguia, H., Bellera, C. L., Talevi, A., Bruno-Blanch, L. y Rocha, L. (en proceso). Propylparaben combined with antiepileptic drugs modifies pentylenetetrazol induced seizures in rats.
- Eriksson, E., Andersen, H. R. y Ledin, A. (2008). Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities. *Journal of Hazardous Materials*, 156(1–3), 240–259. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.12.022
- Eslamizade, M. J., Saffarzadeh, F., Mousavi, S. M. M., Meftahi, G. H., Hosseinmardi, N., Mehdizadeh, M. y Janahmadi, M. (2015). Alterations in CA1 pyramidal neuronal intrinsic excitability mediated by Ih channel currents in a rat model of amyloid beta pathology. *Neuroscience*, 305, 279–292. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.087
- EU Pharmaceutical Informations. (2015). Lyrica. URL [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20150122130852/anx\\_130852\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20150122130852/anx_130852_en.pdf) (Consultado 13-03-16)

- European Medicines Agency. (2014). Rufinamide. URL [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR-\\_Product\\_Information/human/000660/WC500032937.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR-_Product_Information/human/000660/WC500032937.pdf) (Consultado 12-03-16)
- Fernández, M., Lao-Peregrín, C. y Martín, E. D. (2010). Flufenamic acid suppresses epileptiform activity in hippocampus by reducing excitatory synaptic transmission and neuronal excitability. *Epilepsia*, 51(3), 384–390. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02279.x
- Final Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, and Butylparaben. (1984). *International Journal of Toxicology*, 3(5), 147–209. doi:10.3109/10915818409021274
- Fozzard, H. a. y Lipkind, G. M. (2010). The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel. *Marine Drugs*, 8(2), 219–234. doi:10.3390/md8020219
- Freese, E., Sheu, C. W. y Galliers, E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241, 321–325. doi:10.1038/241321a0
- French, J. A. (2007). Refractory epilepsy: Clinical overview. *Epilepsia*, 48(SUPPL. 1), 3–7. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.00992.x
- Fujita, F., Moriyama, T., Higashi, T., Shima, A. y Tominaga, M. (2007). Methyl p-hydroxybenzoate causes pain sensation through activation of TRPA1 channels. *British Journal of Pharmacology*, 151(1), 153–60. doi:10.1038/sj.bjp.0707219
- Galvan, M., Grafe, P. y Bruggencate, G. Ten. (1982). Convulsant actions of 4-aminopyridine on the guinea-pig olfactory cortex slice. *Brain Research*, 241(1), 75–86. doi:10.1016/0006-8993(82)91230-6
- Garduño, J., Galván, E., Fernández De Sevilla, D. y Buño, W. (2005). 1-Ethyl-2-benzimidazolinone (EBIO) suppresses epileptiform activity in in vitro hippocampus. *Neuropharmacology*, 49(3), 376–388. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.03.021
- Gazin, V., Marsden, E. y Marguerite, F. (2013). Oral propylparaben administration to juvenile male wistar rats did not induce toxicity in reproductive organs. *Toxicological Sciences*, 136(2), 392–401. doi:10.1093/toxsci/kft211
- Gelb, A. W., Gignac, E., Manninen, P. H., Farrar, J. K. y Lee, D. H. (1992). Methylparaben and propylparaben do not alter cerebral blood flow in humans. *Canadian Journal of Anaesthesia*, 39(7), 691–694. doi:10.1007/BF03008232
- Goldin, A. L. (1999). Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Ann N Y Acad Sci*, 868, 38–50. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb11272.x
- Heinemann, U., Kann, O. y Schuchmann, S. (2006). An Overview of In Vitro Seizure Models in Acute and Organotypic Slices. In *Models of Seizures and Epilepsy* (pp. 35–44). doi:10.1016/B978-012088554-1/50006-2
- Heinemann, U. y Staley, K. J. (2014). What Is the Clinical Relevance of In Vitro Epileptiform Activity? (Vol. 813, pp. 25–41). doi:10.1007/978-94-017-8914-1\_2
- Henze, D. A. y Buzsáki, G. (2001). Action potential threshold of hippocampal pyramidal cells in vivo is increased by recent spiking activity. *Neuroscience*, 105(1), 121–130. doi:10.1016/S0306-4522(01)00167-1

- Hille, B. (1977). Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *The Journal of General Physiology*, 69(4), 497–515. doi:10.1085/jgp.69.4.497
- Hodgkin, A. L. y Huxley, A. F. (1952a). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117(4), 500–544. doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004764
- Hodgkin, A. L. y Huxley, A. F. (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4), 449–472. doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004717
- Hodgkin, A. L. y Huxley, A. F. (1952c). The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4), 473–496. doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004718
- Hodgkin, A. L. y Huxley, A. F. (1952d). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4), 497–506. doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004719
- Holt, G. R., Koch, C., Douglas, R. J. y Mahowald, M. (1997). The Membrane Time Constant and Firing Rate Dynamics, (818), 1–18.
- Hu, H., Vervaeke, K. y Storm, J. F. (2002). Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na<sup>+</sup> current in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology*, 545(Pt 3), 783–805. doi:10.1113/jphysiol.2002.029249
- Huang, C.-J., Schild, L. y Moczydlowski, E. G. (2012). Use-dependent block of the voltage-gated Na(+) channel by tetrodotoxin and saxitoxin: effect of pore mutations that change ionic selectivity. *The Journal of General Physiology*, 140(4), 435–54. doi:10.1085/jgp.201210853
- Inoue, K., Nakazawa, K., Inoue, K., Fujimori, K. y Takanaka, A. (1994). Modulation by alkyl p-hydroxybenzoates of voltage- and ligand-gated channels in peripheral neuronal cells. *Neuropharmacology*, 33(7), 891–896. doi:10.1016/0028-3908(94)90187-2
- Irnich, W. (2010). The terms “chronaxie” and “rheobase” are 100 years old. *PACE - Pacing and Clinical Electrophysiology*, 33(4), 491–496. doi:10.1111/j.1540-8159.2009.02666.x
- Isokawa, M. (1997). Membrane time constant as a tool to assess cell degeneration. *Brain Research Protocols*, 1(2), 114–116. doi:10.1016/S1385-299X(96)00016-5
- Jenerick, H. (1963). Phase Plane Trajectories of the Muscle Spike Potential. *Biophysical Journal*, 3(5), 363–377.
- Ji, X., Xu, Z., Criswell, H. E. y Boysen, P. G. (2004). Propyl paraben inhibits voltage-dependent sodium channels and protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury. *Life Sciences*, 74(24), 3043–3052. doi:10.1016/j.lfs.2003.11.007
- Jo, S. y Bean, B. P. (2014). Sidedness of Carbamazepine Accessibility to Voltage-Gated Sodium Channels. *Molecular Pharmacology*, 85(2), 381–387. doi:10.1124/mol.113.090472
- Jones, P. S., Thigpen, D., Morrison, J. L. y Richardson, A. P. (1956). p-Hydroxybenzoic

- acid esters as preservatives III. The physiological disposition of p-Hydroxybenzoic acid and its esters. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 45(4), 268–273. doi:10.1002/jps.3030450421
- Kandel, E. R. y Spencer, W. A. (1961). Electrophysiology of hippocampal neurons. II. After-potentials and repetitive firing. *Journal of Neurophysiology*, 24, 243–259.
- Kandel, E. y Schwartz, J. (2013). *Principles of Neural Science, Fifth Edition*. McGraw-Hill Education.
- Kiss, T. (2008). Persistent sodium channels: origin and function. *Acta Biologica Hungarica*, 59, 1–12. doi:10.1556/ABiol.59.2008.Suppl.1
- Kitamura, Y. (1979). Effects of local anaesthetics on the peripheral nerve and the spinal cord. *Osaka City Medical Journal.*, 25(1), 7–24.
- Klaft, Z. J., Hollnagel, J. O., Salar, S., Caliřkan, G., Schulz, S. B., Schneider, U. C., ... Heinemann, U. (2016). Adenosine A1 receptor-mediated suppression of carbamazepine-resistant seizure-like events in human neocortical slices. *Epilepsia*, 746–756. doi:10.1111/epi.13360
- Koch, C. (2004). The Hodgkin and Huxley Model of Action Potential Generation. In *Biophysics of Computation: Information Processing in Single Neurons* (pp. 139–174). Oxford University Press, USA.
- Koester, J. y Siegelbaum, S. A. (2014). Membrane Potential. In E. R. Kandel, J. M. Schwarz, y T. M. Jessell (Eds.), *Principles of Neural Science* (4th ed.). McGraw-Hill.
- Köhling, R. (2002). Voltage-gated Sodium Channels in Epilepsy. *Epilepsia*, 43(11), 1278–1295. doi:10.1046/j.1528-1157.2002.40501.x
- Köhling, R. y Avoli, M. (2006). Methodological approaches to exploring epileptic disorders in the human brain in vitro. *Journal of Neuroscience Methods*, 155(1), 1–19. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.04.009
- Köhling, R., Schwartzkroin, P. a. y Avoli, M. (2006). Studying Epilepsy in the Human Brain In Vitro. In *Models of Seizures and Epilepsy* (pp. 89–101). doi:10.1016/B978-012088554-1/50010-4
- Kuo, C. C. (1998). A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal Na<sup>+</sup> channels. *Molecular Pharmacology*, 54(4), 712–21.
- Kuo, C. C. y Bean, B. P. (1994). Na<sup>+</sup> channels must deactivate to recover from inactivation. *Neuron*, 12(4), 819–829. doi:10.1016/0896-6273(94)90335-2
- Lamas, J. A. (2005). Evolución del concepto de potencial de reposo neuronal. Aspectos básicos y clínicos. *Revista de Neurología*, 41(9), 538–49.
- Lang, D. G., Wang, C. M. y Cooper, B. R. (1993). Lamotrigine, phenytoin and carbamazepine interactions on the sodium current present in N4TG1 mouse neuroblastoma cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 266(2), 829–835.
- Lavecchia, A. y Di Giovanni, C. (2013). Virtual screening strategies in drug discovery: A critical review. *Current Medicinal Chemistry*, 20(April 2016), 2839–2860. doi:10.2174/09298673113209990001



- Li, C.-L. y McIlwain, H. (1957). Maintenance of resting membrane potentials in slices of mammalian cerebral cortex and other tissues in vitro. *The Journal of Physiology*, 139(2), 178–190. doi:10.1113/jphysiol.1957.sp005885
- Loscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R. E. y Schmidt, D. (2013). New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 12(10), 757–776. doi:10.1038/nrd4126
- Ma, Y. y Marquis, R. E. (1996). Irreversible paraben inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Lett Appl Microbiol*, 23(5), 329–333.
- Maccaferri, G. y McBain, C. J. (1996). The hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *The Journal of Physiology*, 497 ( Pt 1), 119–130. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021754
- Macdonald, R. L. (1988). Anticonvulsant drug actions on neurons in cell culture. *Journal of Neural Transmission*, 72(3), 173–183. doi:10.1007/BF01243417
- Macdonald, R. L. (1989). Antiepileptic Drug Actions. *Epilepsia*, 30(s1), S19–S28. doi:10.1111/j.1528-1157.1989.tb05810.x
- Macdonald, R. L., McLean, M. J. y Skerritt, J. H. (1985). Anticonvulsant drug mechanisms of action. *Federation Proceedings*, 44(10), 2634–2639.
- Matsumoto, H. y Marsan, C. a. (1964). Cortical Cellular Phenomena in Experimental Epilepsy: Interictal Manifestations. *Experimental Neurology*, 9, 286–304. doi:10.1016/0014-4886(64)90026-3
- Matthews, C., Davidson, J., Bauer, E., Morrison, J. L. y Richardson, A. P. (1956). P-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. II. Acute and chronic toxicity in dogs, rats, and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association*, 45(4), 260–267.
- McCormick, D. A. y Contreras, D. (2001). On The Cellular and Network Bases of Epileptic Seizures. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 815–846. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.815
- McLean, M. J. y Macdonald, R. L. (1983). Multiple actions of phenytoin on mouse spinal cord neurons in cell culture. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 227(3), 779–789.
- McLean, M. J. y Macdonald, R. L. (1986a). Carbamazepine and 10,11-epoxycarbamazepine produce use- and voltage-dependent limitation of rapidly firing action potentials of mouse central neurons in cell culture. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 238(2), 727–38.
- McLean, M. J. y Macdonald, R. L. (1986b). Sodium valproate, but not ethosuximide, produces use- and voltage-dependent limitation of high frequency repetitive firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 237(3), 1001–1011.
- McLean, M. J. y Macdonald, R. L. (1988). Benzodiazepines, but not beta carbolines, limit high frequency repetitive firing of action potentials of spinal cord neurons in cell culture. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 244(2), 789–95. doi:10.1007/978-3-319-02868-2\_3

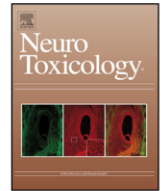
- McLean, M. J. y McDonald, R. L. (1984). Limitation of high-frequency repetitive firing of cultured mouse neurons: An in vitro assay of anticonvulsant drug actions. *Annals of Neurology*, 16(1), 109–156. doi:10.1002/ana.410160128
- Miles, G. B., Dai, Y. y Brownstone, R. M. (2005). Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *The Journal of Physiology*, 566(Pt 2), 519–32. doi:10.1113/jphysiol.2005.086033
- Nakagawa, Y. y Moldéus, P. (1998). Mechanism of p-Hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 55(11), 1907–1914. doi:10.1016/S0006-2952(98)00097-5
- National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences, y National Institutes of Health. (2015). Chemical Properties CAS Registry Number: 94-13-3. URL [http://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ntpviews/index.cfm?action=testarticle.propertiesycas\\_number=94-13-3#2](http://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ntpviews/index.cfm?action=testarticle.propertiesycas_number=94-13-3#2) (Consultado 13-03-16)
- Nature Subjects. (2016). Intrinsic Excitability. URL <http://www.nature.com/subjects/intrinsic-excitability> (Consultado 13-12-16)
- Naundorf, B., Wolf, F. y Volgushev, M. (2006). Unique features of action potential initiation in cortical neurons. *Nature*, 440(7087), 1060–1063. doi:10.1038/nature04610
- Nes, I. F. y Eklund, T. (1983). The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(2), 237–242. doi:10.1111/j.1365-2672.1983.tb02612.x
- NeuroElectro. (2016). NeuroElectro :: Hippocampus CA1 pyramidal cell Data Neuron electrophysiology data values.
- Nguyen, T., Clare, B., Guo, W. y Martinac, B. (2005). The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*. *European Biophysics Journal*, 34(5), 389–395. doi:10.1007/s00249-005-0468-x
- Niespodziany, I., Klitgaard, H. y Margineanu, D. G. (2004). Is the persistent sodium current a specific target of anti-absence drugs? *Neuroreport*, 15(6), 1049–1052. doi:10.1097/01.wnr.0000124330.89388.66
- Norris, S. K. y King, a E. (1997). Electrophysiological effects of the anticonvulsant remacemide hydrochloride and its metabolite arl12495aa on rat ca1 hippocampal neurons in vitro. *Neuropharmacology*, 36(7), 951–959. doi:10.1016/S0028-3908(97)00069-5
- Novartis. (2010). Oxcarbazepine. URL <http://www.guildlink.com.au/gc/ws/nv/cmi.cfm?product=nvctrior10914> (Consultado 23-03-16)
- Novartis. (2016). Carbamazepine. URL <http://www.guildlink.com.au/gc/ws/nv/pi.cfm?product=nvptgror10815> (Consultado 6-08-16)
- Oishi, S. (2002). Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food and Chemical Toxicology*, 40(12), 1807–1813. doi:10.1016/S0278-6915(02)00204-1
- Olmo, A., Calzada, J. y Nuñez, M. (2015). Benzoic Acid and Its Derivatives as Naturally

- Occurring Compounds in Foods and as Additives : Uses , Exposure and Controversy, 8398(December), 0–86. doi:10.1080/10408398.2015.1087964
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. y Catterall, W. a. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, 475(7356), 353–358. doi:10.1038/nature10238
- Peng, X., Adachi, K., Chen, C., Kasai, H., Kanoh, K., Shizuri, Y. y Misawa, N. (2006). Discovery of a marine bacterium producing 4-hydroxybenzoate and its alkyl esters, parabens. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5556–5561. doi:10.1128/AEM.00494-06
- Perreault, P. y Avoli, M. (1991). Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, 65(4), 771–85.
- Porter, R. J. y Meldrum, B. S. (2015). Antiseizure Drugs. In B. G. Katzung y A. J. Trevor (Eds.), *Basic y Clinical Pharmacology* (13th ed., pp. 396–420). McGraw Hill Professional.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A.-S., Mcnamara, J. O. y Williams, S. M. (2004). *Neuroscience. Sunderland* (3rd ed., Vol. 3). Massachusetts: Sinauer Associates. doi:978-0878937257
- Quan, C., Mok, W. M. y Wang, G. K. (1996). Use-dependent inhibition of Na<sup>+</sup> currents by benzocaine homologs. *Biophysical Journal*, 70(1), 194–201. doi:10.1016/S0006-3495(96)79563-2
- Quesney, L. F. (1986). Clinical and EEG features of complex partial seizures of temporal lobe origin. *Epilepsia*, 27 Suppl 2, S27-45. doi:10.1111/j.1528-1157.1986.tb05738.x
- Ragsdale, D. S., Scheuer, T. y Catterall, W. A. (1991). Frequency and voltage-dependent inhibition of type IIA Na<sup>+</sup> channels, expressed in a mammalian cell line, by local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant drugs. *Molecular Pharmacology*, 40(5), 756–65.
- Raza, M., Shaheen, F., Choudhary, M. I., Sombati, S., Rahman, A. y DeLorenzo, R. J. (2004). Inhibition of sustained repetitive firing in cultured hippocampal neurons by an aqueous fraction isolated from *Delphinium denudatum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2–3), 367–74. doi:10.1016/j.jep.2003.10.017
- Rogawski, M. a, y Löscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(7), 553–564. doi:10.1038/nrn1430
- Routledge, E. J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J. y Sumpter, J. P. (1998). Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 153(1), 12–9. doi:10.1006/taap.1998.8544
- Rutecki, P. A., Grossman, R. G., Armstrong, D. y Irish-Loewen, S. (1989). Electrophysiological connections between the hippocampus and entorhinal cortex in patients with complex partial seizures. *J. Neurosurg.*, 70, 667–675.
- Sah, P. (1996). Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> currents in neurons: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci*, 19, 150–154.
- Sanofi. (2013). Product Information: Epilim, 19. doi:10.1007/s00299-011-1150-7

- Santana-Gómez, C. E. (2012). *Evaluación de los efectos del propilparabeno en el status epilepticus y daño neuronal inducido por el modelo de litio-pilocarpina*. *Cinvestav*.
- Santana-Gómez, C. E., Orozco-Suárez, S. A., Talevi, A., Bruno-Blanch, L., Magdaleno-Madrigal, V. M., Fernández-Mas, R. y Rocha, L. (2017). Propylparaben applied after pilocarpine-induced status epilepticus modifies hippocampal excitability and glutamate release in rats. *NeuroToxicology*, *59*, 110–120. doi:10.1016/j.neuro.2017.01.009
- Sasseville, D. (2004). Hypersensitivity to preservatives. *Dermatologic Therapy*, *17*(3), 251–263. doi:10.1111/j.1396-0296.2004.04028.x
- SCCS. (2013). *Scientific Committee on Consumer Safety Parabens Updated request for a scientific opinion on propyl- and butylparaben COLIPA n ° P82*. doi:10.2772/66369
- Schwartzkroin, P. A. y Prince, D. A. (1977). Penicillin-induced epileptiform activity in the hippocampal in vitro preparation. *Annals of Neurology*, *1*(5), 463–9. doi:10.1002/ana.410010510
- Schwarz, S. K. y Puil, E. (1998). Analgesic and sedative concentrations of lignocaine shunt tonic and burst firing in thalamocortical neurones. *British Journal of Pharmacology*, *124*(8), 1633–1642. doi:10.1038/sj.bjp.0702015
- Siniscalchi, A., Calabresi, P., Mercuri, N. B. y Bernardi, G. (1997). Epileptiform discharge induced by 4-aminopyridine in magnesium-free medium in neocortical neurons: Physiological and pharmacological characterization. *Neuroscience*, *81*(1), 189–197. doi:10.1016/S0306-4522(97)00178-4
- Soni, M. G., Burdock, G. A., Taylor, S. L. y Greenberg, N. A. (2001). Safety assessment of propyl paraben: A review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, *39*(6), 513–532. doi:10.1016/S0278-6915(00)00162-9
- Soni, M. G., Carabin, I. G. y Burdock, G. A. (2005). Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology*, *43*(7), 985–1015. doi:10.1016/j.fct.2005.01.020
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews. Neuroscience*, *9*(3), 206–221. doi:10.1038/nrn2286
- Stables, J. P. y Kupferberg, H. J. (1997). The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: preclinical anticonvulsant screening project. *Molecular and Cellular Targets for Antiepileptic Drugs*, *23129*, 191–198.
- Stafstrom, C. E. (2007). Persistent Sodium Current and Its Role in Epilepsy. *Epilepsy Currents*, *7*(1), 15–22. doi:10.1111/j.1535-7511.2007.00156.x
- Stolerman, I. P. (2015). *Encyclopedia of Psychopharmacology. Encyclopedia of Psychopharmacology*. doi:10.1007/978-3-642-36172-2
- Storm, J. F. (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology*, *385*(1), 733–759. doi:10.1113/jphysiol.1987.sp016517
- Strichartz, G. y Cohen, I. S. (1978). Letter to the Editor:  $V_{max}$  as a Measure of GNA in Nerve and Cardiac Membranes. *Biophysical Journal*, *23*(1), 153–156. doi:10.1016/S0006-3495(78)85440-X

- Talevi, A., Bellera, C. L., Castro, E. A. y Bruno-Blanch, L. E. (2007). A successful virtual screening application: Prediction of anticonvulsant activity in MES test of widely used pharmaceutical and food preservatives methylparaben and propylparaben. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21(9), 527–538. doi:10.1007/s10822-007-9136-9
- Tamagnini, F., Scullion, S., Brown, J. T. y Randall, A. D. (2014). Low concentrations of the solvent dimethyl sulphoxide alter intrinsic excitability properties of cortical and hippocampal pyramidal cells. *PLoS ONE*, 9(3). doi:10.1371/journal.pone.0092557
- Tancredi, V., Hwa, G. G. C., Zona, C., Brancati, A. y Avoli, M. (1990). Low magnesium epileptogenesis in the rat hippocampal slice: electrophysiological and pharmacological features. *Brain Research*, 511(2), 280–290. doi:10.1016/0006-8993(90)90173-9
- Tavares, R. S., Martins, F. C., Oliveira, P. J., Ramalho-Santos, J. y Peixoto, F. P. (2009). Parabens in male infertility-Is there a mitochondrial connection? *Reproductive Toxicology*, 27(1), 1–7. doi:10.1016/j.reprotox.2008.10.002
- Traub, R. D., Borck, C., Colling, S. B. y Jefferys, J. G. (1996). On the structure of ictal events in vitro. *Epilepsia*, 37(9), 879–891.
- Tripathy, S. J., Burton, S. D., Geramita, M., Gerkin, R. C. y Urban, N. N. (2015). Brain-wide analysis of electrophysiological diversity yields novel categorization of mammalian neuron types. *Journal of Neurophysiology*, 113(10), 3474–3489. doi:10.1152/jn.00237.2015
- Trombin, F., Gnatkovsky, V. y de Curtis, M. (2011). Changes in action potential features during focal seizure discharges in the entorhinal cortex of the in vitro isolated guinea pig brain. *Journal of Neurophysiology*, 106(3), 1411–1423. doi:10.1152/jn.00207.2011
- Upton, N. (1994). Mechanisms of action of new antiepileptic drugs: rational design and serendipitous findings. *Trends in Pharmacological Sciences*, 15(12), 456–63. doi:10.1016/0165-6147(94)90059-0
- Vervaeke, K., Hu, H., Graham, L. J. y Storm, J. F. (2006). Contrasting effects of the persistent Na<sup>+</sup> current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron*, 49(2), 257–270. doi:10.1016/j.neuron.2005.12.022
- Vladimirov, N., Tu, Y. y Traub, R. D. (2012). Shortest Loops are Pacemakers in Random Networks of Electrically Coupled Axons. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 6(April), 1–12. doi:10.3389/fncom.2012.00017
- Willow, M., Gonoï, T. y Catterall, W. a. (1985). Voltage clamp analysis of the inhibitory actions of diphenylhydantoin and carbamazepine on voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells. *Molecular Pharmacology*, 27(5), 549–558.
- Woolley, C. S. (2007). Acute Effects of Estrogen on Neuronal Physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 657–680. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105219
- Xie, W. yu, Y. H., Du, Y. P., Zhao, Y. Y., Li, C. Z. yu, L., ... Xing, J. L. (2013). Saikosaponin a enhances transient inactivating potassium current in rat hippocampal CA1 neurons. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. doi:10.1155/2013/413092
- Yamada-Hanff, J. y Bean, B. P. (2013). Persistent sodium current drives conditional

- pacemaking in CA1 pyramidal neurons under muscarinic stimulation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(38), 15011–21. doi:10.1523/JNEUROSCI.0577-13.2013
- Yamamoto, C. y McIlwain, H. (1966). Potentials evoked in vitro in Preparations from the Mammalian Brain. *Nature*, 210(5040), 1055–1056. doi:10.1038/2101055a0
- Yamamoto, H., Tamura, I., Hirata, Y., Kato, J., Kagota, K., Katsuki, S., ... Tatarazako, N. (2011). Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach. *Science of the Total Environment*, 410–411, 102–111. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.09.040
- Yonekawa, W. D., Kapetanovic, I. M. y Kupferberg, H. J. (1995). The effects of anticonvulsant agents on 4-aminopyridine induced epileptiform activity in rat hippocampus in vitro. *Epilepsy Research*, 20(2), 137–150. doi:10.1016/0920-1211(94)00077-A
- Yu, F. H. y Catterall, W. A. (2004). The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. *Science Signaling*, 2004(253), re15-re15. doi:10.1126/stke.2532004re15
- Zhang, C., Bosch, M. A., Qiu, J., Rønnekleiv, O. K. y Kelly, M. J. (2015). 17 $\beta$ -Estradiol increases persistent Na(+) current and excitability of AVPV/PeN Kiss1 neurons in female mice. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 29(4), 518–27. doi:10.1210/me.2014-1392
- Zhang, Y., Huang, Y., Liu, X., Wang, G., Wang, X. y Wang, Y. (2015). Estrogen suppresses epileptiform activity by enhancing Kv4.2-mediated transient outward potassium currents in primary hippocampal neurons. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(3), 865–872. doi:10.3892/ijmm.2015.2287
- Zhang, Y., Zhao, J., Zhang, T. y Yang, Z. (2010). In vitro assessment of the effect of methylene blue on voltage-gated sodium channels and action potentials in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *NeuroToxicology*, 31(6), 724–729. doi:10.1016/j.neuro.2010.07.001
- Zhang, Z. J., Koifman, J., Shin, D. S. ye, H., Florez, C. M., Zhang, L., ... Carlen, P. L. (2012). Transition to Seizure: Ictal Discharge Is Preceded by Exhausted Presynaptic GABA Release in the Hippocampal CA3 Region. *Journal of Neuroscience*, 32(7), 2499–2512. doi:10.1523/JNEUROSCI.4247-11.2012



## Full Length Article

# Propylparaben reduces the excitability of hippocampal neurons by blocking sodium channels



Leonardo Lara-Valderrábano, Luisa Rocha, Emilio J. Galván\*

Departamento de Farmacobiología, Cinvestav Sede Sur, México City, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 June 2016

Received in revised form 13 September 2016

Accepted 27 September 2016

Available online 28 September 2016

## Keywords:

Propylparaben

Neuronal excitability

Sodium currents

CA1 pyramidal cells

## ABSTRACT

Propylparaben (PPB) is an antimicrobial preservative widely used in food, cosmetics, and pharmaceuticals. Virtual screening methodologies predicted anticonvulsant activity of PPB that was confirmed *in vivo*. Thus, we explored the effects of PPB on the excitability of hippocampal neurons by using standard patch clamp techniques. Bath perfusion of PPB reduced the fast-inactivating sodium current ( $I_{Na}$ ) amplitude, causing a hyperpolarizing shift in the inactivation curve of the  $I_{Na}$ , and markedly delayed the sodium channel recovery from the inactivation state. Also, PPB effectively suppressed the riluzole-sensitive, persistent sodium current ( $I_{NaP}$ ). PPB perfusion also modified the action potential kinetics, and higher concentrations of PPB suppressed the spike activity. Nevertheless, the modulatory effects of PPB did not occur when PPB was internally applied by whole-cell dialysis. These results indicate that PPB reduces the excitability of CA1 pyramidal neurons by modulating voltage-dependent sodium channels. The mechanistic basis of this effect is a marked delay in the recovery from inactivation state of the voltage-sensitive sodium channels. Our results indicate that similar to local anesthetics and anticonvulsant drugs that act on sodium channels, PPB acts in a use-dependent manner.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Propylparaben (PPB) is an alkyl ester of *p*-hydroxybenzoic acid commonly used as an antimicrobial preservative in foods, drugs, and cosmetics. Due to its extensive use for more than 70 years, pharmacological and toxicological characteristics of PPB are constantly reviewed (Aalto et al., 1953; Soni et al., 2001). Acute toxicity studies indicate that PPB is not significantly toxic, mutagenic, or carcinogenic (“Final Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, and Butylparaben,” 1984). However, some studies have shown that parabens bind to estrogen receptors, exerting disrupting endocrine effects (Chen et al., 2007; Routledge et al., 1998). The information of the adverse effects of parabens, conflicting results and some controversial issues, is available elsewhere (Błędzka et al., 2014; Olmo et al., 2015; Tavares et al., 2009).

In addition, it is well known that other parabens, including Methyl- and butylparaben inhibits  $Ba^{2+}$  and  $K^+$  currents in PC-12 cells (Inoue et al., 1994). In contrast, little is known about the

effects of PPB on ion channels. For instance, PPB induces  $K^+$  efflux on bacterial membranes (Bredin et al., 2005). This effect has been ascribed to a possible modulation of the mechanosensitive  $K^+$  channels (Nguyen et al., 2005). In rodents, the oral administration of PPB was reported to induce ataxia, paralysis and deep depression comparable to the effects of anesthesia (Matthews et al., 1956). In another study, the effect of parabens used as preservative of local anesthetics preparations demonstrated that PPB (1 mM) blocks the electrical conduction on isolated peripheral nerve (Kitamura, 1979). Lastly, PPB reversibly blocks voltage-gated sodium channels of rat cardiomyocytes in a concentration- and voltage-dependent manner (Ji et al., 2004).

The modulation of voltage-dependent currents suggests that parabens, including PPB, modify the excitability of central nervous system neurons. For example, by using a virtual screening methodology, a study successfully predicted the anticonvulsant activity of PPB, which was confirmed with a maximal electroshock stimulation test (Talevi et al., 2007).

Although the evidence above indicates that parabens exert modulatory activity on ion channels, there is no information available of the effects that PPB might exert on the electrophysiological properties of neurons in the central nervous system. Therefore, in the present study, we examined the effects of PPB on

\* Corresponding author at: Departamento de Farmacobiología, Cinvestav Sede Sur, Calz. Tenorios No. 235, Col. Granjas Coapa, México City, 14330, Mexico.

E-mail address: ejalvan@cinvestav.mx (E.J. Galván).

the voltage-gated Na<sup>+</sup> channels, neuronal excitability and passive membrane properties of CA1 neurons on acute hippocampal slices. We demonstrate that PPB evokes a significant concentration-dependent decrease of the neuronal excitability by blocking voltage-gated sodium channels, a mechanism that might explain the anticonvulsant and neuroprotective effect exerted by this relevant paraben.

## 2. Methods

### 2.1. Experimental procedures

Animal use was in accordance with the Mexican Official Norm for utilization and care of laboratory animals “NOM-062-ZOO-1999” and approved by the local Ethics Committee (Cinvestav-IPN). Wistar rats (28 days old) were deeply anesthetized with 50 mg/kg pentobarbital i.p., decapitated, and their brains were quickly removed and placed in ice-cold (4° C) sucrose slicing solution containing the following composition (in mM): 210 Sucrose, 2.8 KCl, 2 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub> and 10 D-(+)-Glucose. Transverse hippocampal slices (385 μm thick) obtained with a Vibratome (Leica, VT1000 S, Nussloch, Germany) were incubated for 30 min at 30° C and then stabilized for at least 1 h at room temperature in a solution containing (in mM): 125 NaCl,

2.5 KCl, 1.2 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 4 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub> and 10 D-(+)-Glucose. Slices were transferred to an immersion recording chamber placed on an upright microscope (Nikon ECLIPSE FN1, Nikon Instruments, USA), equipped with infrared differential interference contrast (DIC) video camera. The slices were superfused at a rate of 4–6 ml/min with bubbled ACSF and heated to 30–33° C during the recordings. The composition of the standard artificial cerebrospinal fluid (ACSF) was (in mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1.25 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub> and 10 D-(+)-Glucose. The ACSF was continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub> carbogen mixture. The total exchange of solution in the recording chamber was complete within ≈2.5 min.

To isolate the sodium currents, a modified ACSF containing (in mM): 125 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 KCl, 1.25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 10 4-Aminopyridine (4-AP), 20 Tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 16 D-(+)-Glucose and 200 μM CdCl<sub>2</sub> (Zhang et al., 2010) was used instead. PPB was prepared daily, dissolved in DMSO and deionized water as a stock solution. DMSO volume diluted in ACSF did not exceed 0.04% of total volume, and the preparation was bath applied using a peristaltic pump.

### 2.2. Electrophysiology

Pyramidal neurons located in the *stratum pyramidale* of CA1 were identified based on size and shape. The whole-cell recordings were obtained using an Axopatch-1D amplifier (Molecular Devices, USA). Patch pipettes (4–8 MΩ) were back-filled with an internal solution containing (in mM): 135 K<sup>+</sup>-gluconate (substituted with 135 Methanesulfonate K<sup>+</sup> for the *I*<sub>NaP</sub> experiments), 10 KCl, 5 NaCl, 10 HEPES, 1 EGTA, 2 Mg<sup>2+</sup>-ATP, 0.4 Na<sup>+</sup>-GTP, and 10 Phosphocreatine, buffered to pH 7.2–7.3 with KOH. For the isolated sodium currents experiments, the patch pipettes had a resistance of 7–10 MW when backfilled with a solution containing (in mM): 140 CsCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 Mg-ATP, buffered to pH 7.2–7.3 with CsOH. In some experiments, biocytin (0.15%) was added to the pipette solution to allow subsequent identification of the recorded neurons based on morphology. In a set of experiments, PPB (50 and 200 μM) was included in the intracellular pipette solution. The inclusion of PPB to the patch pipette yielded no changes in the intracellular solution osmolarity.

The Membrane potential (*V*<sub>m</sub>) of the recorded cells was set to –65 mV by injecting DC current when needed. Series resistance (10–15 MΩ) was continuously monitored, and experiments were rejected if the series resistance changed >20% during the recordings. Input Resistance (*R*<sub>N</sub>) was measured as the slope of the linear portion of the voltage-current plot constructed from the steady-state voltage response to current injections corresponding to –30 pA, 0 pA and 30 pA steps. The hyperpolarization-activated sag was measured by the difference between the peak and the steady state hyperpolarization (as a percentage of the peak) produced by a 1000 ms–300 pA current step (Tamagnini et al., 2015). The rheobase current was measured as the first step of current injection (1000 ms duration, 10 pA increments) that elicited one or more action potentials from *V*<sub>m</sub>. The AP threshold was determined as the voltage where the value of d*V*/d*t* exceeded 20 mV ms<sup>–1</sup>. The AP amplitude was measured as the voltage difference between the threshold and peak of the action potential. The frequency of action potentials (APs) was measured by calculating the number of APs in one second (Hz) elicited by 1000 ms somatic current injections ranging from 0 to 450 pA in 50 pA increments from the *V*<sub>m</sub> (–65 mV).

After the initial break-in, the cells were allowed to stabilize for at least 10 min before the sodium current recordings. Then, the membrane potential was held at –65 mV and slow voltage ramps (20 mV/s) from –98 to –28 mV were applied (Yamada-Hanff and Bean, 2013). For the isolated sodium currents (*I*<sub>Na</sub>), cells were held at –70 mV and current responses were acquired by applying depolarizing pulses (20 ms duration) from –70 to +30 mV. Also, the cells were held at –80 mV and the *I*<sub>Na</sub> was generated by applying pulses from –70 to +60 mV with 10 mV steps. To determine the *I*<sub>Na</sub> steady-state inactivation, cells were held at –70 mV and a double-pulse protocol was applied: first, 50 ms conditioning prepulse was applied at potentials between –95 mV and –15 mV in 5 mV increments, followed by a 20 ms pulse to –10 mV. Lastly, to determine the recovery from inactivation, neurons were held at –90 mV and a double pulse protocol was applied as follows: a 50 ms conditioning pulse to –40 mV (to fully inactivate the sodium currents), and then a 50 ms test pulse of –40 was applied after a series of –90 mV pulses in intervals varying from 2 to 36 ms (in 2 ms increments). With the exception of the *I*<sub>NaP</sub> experiments, a P/4 subtraction procedure was applied on the current protocols.

### 2.3. Statistical evaluation and data analysis

The pClamp 10.5 software (Axon Instruments Inc. Foster City, CA, USA) was used for stimulus generation, data display, acquisition, storage and off-line analysis. Statistical analyses included paired and unpaired Student's *t*-test for comparisons of two groups and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn's or Kruskal-Wallis test (when appropriate) as post hoc evaluation of comparisons to control values. All hypothesis testing was performed with α=0.05. All values are expressed as mean ± SE (unless mentioned otherwise) and statistically significant differences are indicated with an asterisk.

## 3. Results

Whole-cell recordings were obtained from 225 CA1 pyramidal neurons. The cells included in this study exhibited overshooting APs and stable resting membrane potential after the initial break-in. The recorded CA1 pyramidal neurons had a mean RMP of –66.4 ± 0.57 mV; input resistance of 103 ± 3.4 MΩ and did not display spontaneous activity. In a series of preliminary experiments, PPB (200 or 500 μM) was bath perfused and the RMP was monitored up to 40 min. These experiments revealed that PPB did not alter the RMP (n = 7; data not shown).



### 3.1. Effects of PPB on the voltage-gated sodium currents

We first evaluated the effect of PPB on the fast voltage-gated sodium current ( $I_{Na}$ ) of hippocampal neurons. The  $I_{Na}$  was isolated as previously described for acute slices (Zhang et al., 2010; see Methods for details). A series of depolarizing pulses (20 ms) from  $-70$  to  $+30$  mV were applied to elicit current responses that reached a maximal mean value of 750 pA. In the presence of PPB (500  $\mu$ M), the currents exhibited a reduction of the maximal peak amplitude of 46.8% (Fig. 1A, B;  $n=9$ ;  $p < 0.001$ ), suggesting that PPB induces a tonic block of the  $I_{Na}$ . A similar result was observed in the  $I$ - $V$  relationship, as PPB yielded a significant decrease in the peak amplitude from  $-40$  to  $+60$  mV (Fig. 1C,  $n=9$ ;  $p < 0.001$ ). Lastly, the blockade of sodium currents in the presence of PPB was corroborated by converting the mean  $I_{Na}$  peak to current density, in which PPB caused a comparable block, as illustrated in Fig. 1D (current density in control =  $-53.18 \pm 0.54$ ; current density in the presence of PPB =  $-34.01 \pm 5.32$  pA/pF;  $p < 0.05$ ).

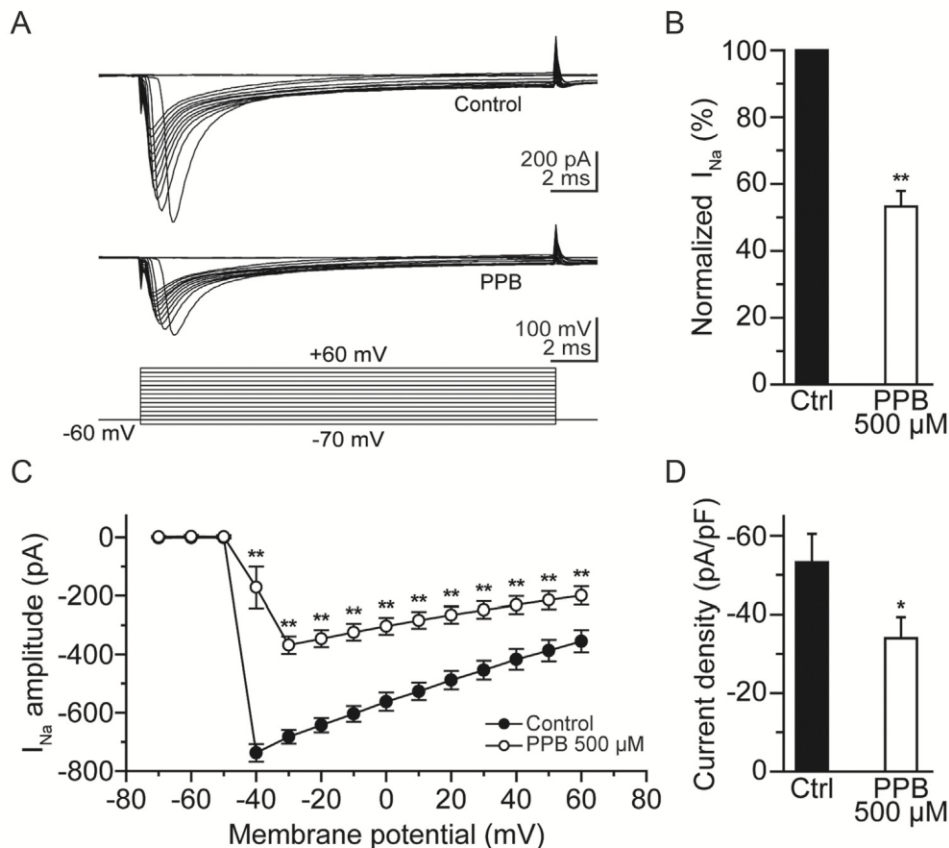
Next, the effect of PPB on the sodium channel steady-state activation was evaluated. The cells were held at  $-70$  mV and depolarizing steps from  $-70$  to  $+40$  mV (20 ms) were applied. The resulting conductance ( $G$ ) was expressed as  $G = I / (V - V_k)$ , where  $V$  is the voltage and  $V_k$  is the reversal potential. The resulting peak conductance ( $G_{max}$ ) was plotted against each test potential (Right axis of the scatter plot on Fig. 2B; filled squares, control; empty squares, PPB). The resultant curves were well fitted (control  $r^2 = 0.97$  and PPB  $r^2 = 0.80$ ) to the Boltzmann function:  $G/G_{max} = 1 / \{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$ , where  $V_h$  is the half maximal conductance and  $k$  is the steady-state slope factor. These experiments indicate a

$V_h$  value of  $-42.58 \pm 9.7$  mV for control and  $-38.74 \pm 1.1$  mV for PPB ( $n=9$ ; n.s.;  $p > 0.05$ ). Also, from the values of the fitting function, it was determined that the slope factor  $k$  was  $1.01 \pm 5.5$  in control and  $3.08 \pm 1.5$  for PPB ( $n=9$ ; n.s.;  $p > 0.05$ ), indicating that PPB did not produce a significant shift in the activation-voltage curve nor a significant change in slope factor  $k$  of the  $I_{Na}$ .

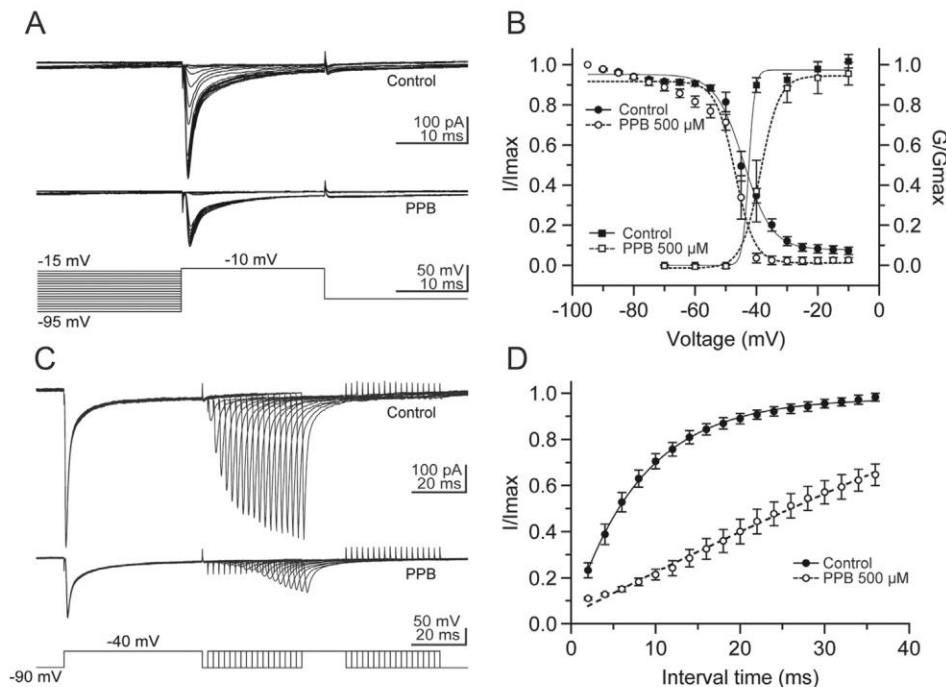
Next, we evaluated the effect of PPB on the inactivation of sodium channels. For this, a double pulse protocol consisting of a 50 ms conditioning prepulse applied at potentials between  $-95$  mV and  $-15$  mV (5 mV increments), followed by a 20 ms pulse to  $-10$  mV (bottom panel, Fig. 2A) was applied. The inactivation conductance-voltage relationships were well fitted (control  $r^2 = 0.95$  and PPB  $r^2 = 0.91$ ) to the Boltzmann function:

$I/I_{max} = 1 / \{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$ , where  $V_h$  is the potential for half-maximal inactivation and  $k$  is the slope factor of the steady-state inactivation curves. The  $V_h$  value for inactivation of the  $I_{Na}$  in control was  $-44.19 \pm 0.45$  mV and  $-47.01 \pm 0.42$  mV for the PPB condition ( $n=9$ ;  $p < 0.001$ ), indicating that PPB evokes a hyperpolarizing shift of the half-maximal inactivation potential of the sodium channels. The  $k$  values were  $4.60 \pm 0.39$  for control and  $3.16 \pm 0.36$  for PPB ( $n=9$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 2B, left axis and circles), indicating that PPB stabilizes the inactivated state of the sodium channel; that binds with higher affinity to this state of the channel and acts in a use-dependant manner (Hille, 1977).

In the next set of experiments, we determined the effect of PPB on the channel recovery from inactivation. The cells were held at  $-90$  mV and a double pulse protocol consisting of a 50 ms conditioning pulse to  $-40$  mV (to fully inactivate the sodium currents) followed by a 50 ms test pulse from  $-40$  after a series of



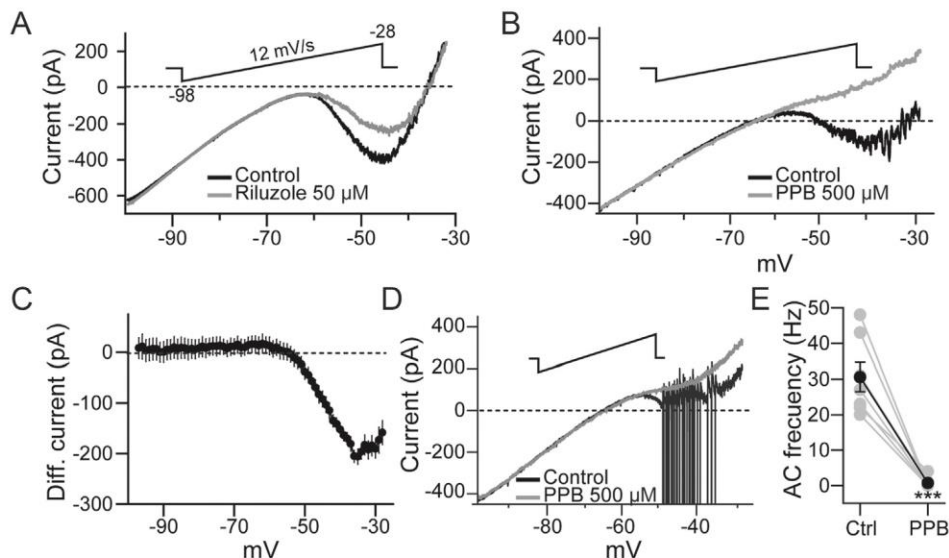
**Fig. 1.** Effects of PPB on the voltage-gated sodium currents of CA1 pyramidal cells A) Representative sodium current elicited by a 20 ms, 10 mV step from  $-70$  mV to  $+60$  mV (upper traces) and the effect of PPB (bottom traces). B) Bar graph summarizing the effects of PPB on the inward sodium currents. C) Averaged  $I_{Na}$  current-voltage curve in control (filled circles) and after the application of PPB (open circles), PPB induced a significant reduction in the  $I_{Na}$  from  $-40$  mV to  $+60$  mV D) Bar graph; summary of the mean peak current density in control (Filled bar) and in the presence of PPB (empty bar) ( $n=9$ ; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).



**Fig. 2.** Effect of PPB on the sodium channel steady-state activation, inactivation and recovery A) Representative traces of the  $I_{Na}$  inactivation kinetics obtained by a double pulse protocol in control and in the presence of PPB. B) Scatter plot of normalized  $I_{Na}$  peak amplitude versus prepulse potential (left axis; circles) and normalized  $G/G_{max}$  values (right axis; squares). Each point in the graph represents mean  $\pm$  SEM acquired at the indicated holding potential. C) Representative current traces of the recovery from inactivation double pulse protocol. Responses were obtained by maintaining cells at a holding potential of  $-90$  mV and a 50 ms conditioning prepulse of  $-40$  mV was applied, then a 50 ms test pulse of  $-40$  mV was applied after a series of steps to  $-90$  mV with varying intervals from 2 to 36 ms (in 2 ms increments). D) Scatter plot summarizing the time recovery curve of the  $I_{Na}$  from inactivation in control (filled circles) and in the presence of PPB (open circles), PPB caused a marked slowing of sodium channel recovery from inactivation.

$-90$  mV pulses in intervals varying from 2 to 36 ms (2 ms increments) was applied (see bottom panel in Fig. 2C). The time course of inactivation was fitted to a monoexponential function ( $I/I_{max} = -A \times \{1 - \exp[-\Delta t/\tau]\}$ ). In control, the  $I_{Na}$  recovery time

constant from inactivation was  $\tau = 8.49$  ms; PPB caused a slower  $I_{Na}$  recovery that was not reliably adjusted ( $\tau$  not calculated), and exhibited a lag before the onset of recovery (Fig. 2D), indicating that PPB markedly delays the sodium channel recovery from the



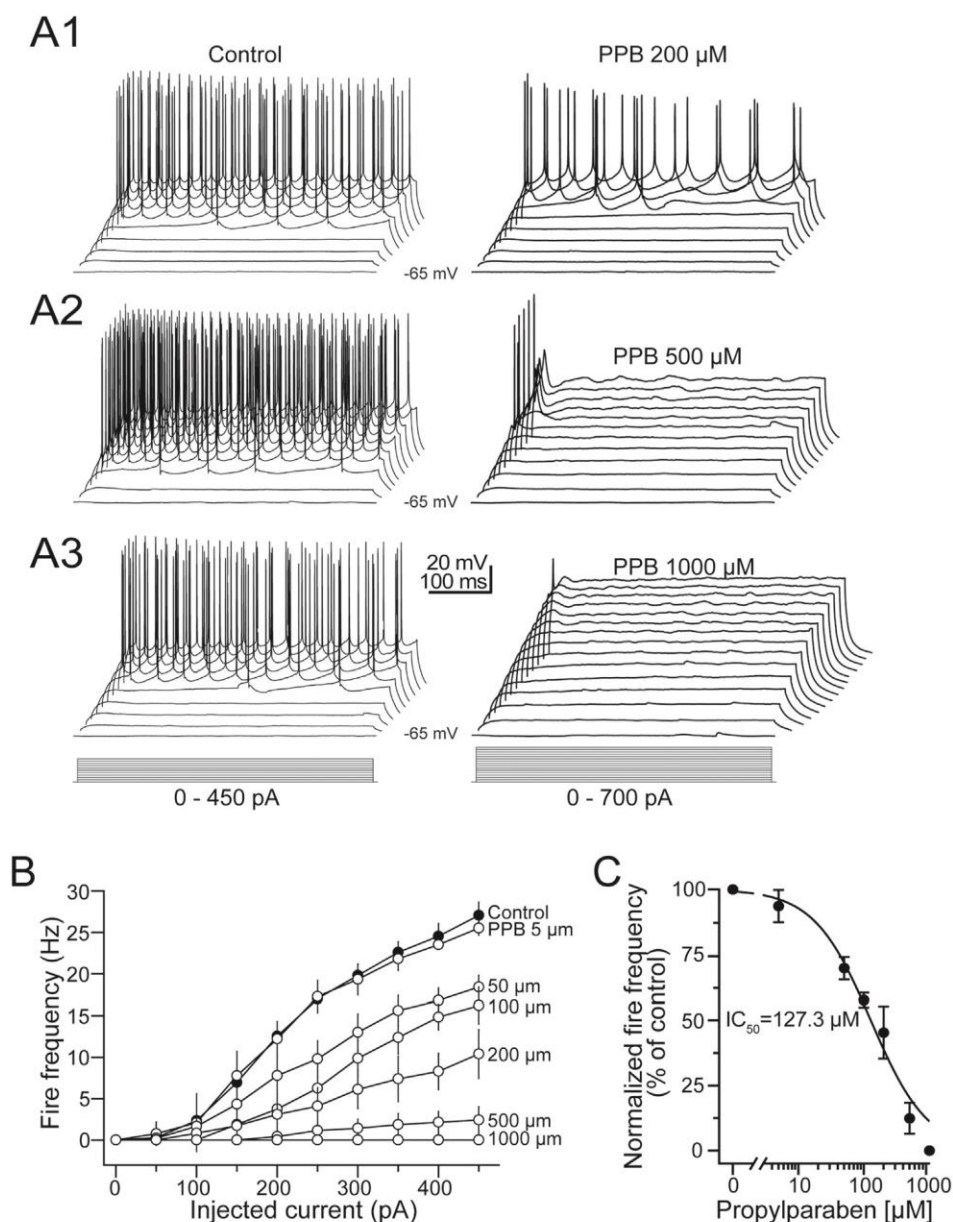
**Fig. 3.** PPB blocks the persistent sodium current ( $I_{NaP}$ ) of CA1 pyramidal cells A) Representative current traces elicited with a slow voltage ramp (12 mV/s; from  $-98$  to  $-28$  mV) in control and in the presence of the  $I_{NaP}$  blocker, riluzole (50  $\mu$ M). B)  $I_{NaP}$  acquired in control and in the presence of PPB 500  $\mu$ M (gray trace). C) Average PPB-sensitive current. The digital subtraction eliminates the current component insensitive to PPB ( $N = 7$ ). D) In some experiments, the voltage ramp evoked unclamped action currents that were successfully suppressed by bath applications of PPB (overimposed gray trace). E) Summary of the effects of PPB on the occurrence of unclamped action currents. PPB induced a marked reduction in the instantaneous frequency of the action currents. Gray circles represent individual experiments; filled circles, the average of all the experiments ( $n = 7$ ;  $***p < 0.001$ ).

inactivated state. The observed lag on the recovery time-course indicates an accumulating PPB use-dependent blockade of the sodium channel.

### 3.2. Effects of PPB on the persistent sodium current ( $I_{NaP}$ )

We also explored whether PPB can modulate the persistent sodium current of pyramidal cells, a depolarizing inward current known to amplify subthreshold responses and repetitive firing (Vervaeke et al., 2006; Yue, 2005). To uncover the  $I_{NaP}$ , pyramidal cells were held in voltage clamp mode ( $-65$  mV) and a slow voltage ramp ( $20$  mV/s) was applied. In control condition, the voltage ramp evoked a linear current response between  $-90$  and  $-60$  mV and a resting membrane potential of  $-64 \pm 4$  mV for  $I = 0$ , followed by an increased inward current that reached a peak amplitude of

$-110.4 \pm 7.5$  pA near  $-40$  mV (Fig. 3A). To confirm that the inward deflection corresponded to the  $I_{NaP}$  we applied the sodium channel blocker TTX ( $200$  nM;  $n = 3$ ; data not shown) or riluzole ( $50$   $\mu$ M), a well characterized  $I_{NaP}$  blocker (Park et al., 2013; Urbani and Belluzzi, 2000). In the presence of riluzole, neither the RMP nor the input resistance was affected; however, bath application of riluzole resulted in a partial suppression of the inward current (Fig. 3A) and was completely abolished in the presence of TTX (data not shown). In another group of cells, the effects of PPB ( $500$   $\mu$ M) on the ramp-evoked inward current was also tested. Bath perfusion of PPB suppressed the inward deflection of the current, reaching a value of  $101.1 \pm 23.8$  pA at  $-45$  mV ( $n = 9$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 3B). The Fig. 3C shows the mean PPB-sensitive component of the recorded currents ( $n = 9$ ); the averaged trace was obtained by subtracting the PPB trace to the control trace. We also noticed that the slow ramp



**Fig. 4.** Propylparaben decreases action potential firing frequency of CA1 pyramidal cells A1, A3 Left panels: Examples of action potential trains (10 continuous sweeps) evoked with 0–450 pA steps in 50 pA increments. Right panels are the voltage responses from the same cells in the presence of PPB at the indicated concentration. In the presence of PPB 1000  $\mu$ M, the current stimulation reached 700 pA (15 continuous voltage sweeps), but not spike activity was observed. B) Scatter plot constructed from the average firing frequency of pyramidal cells and the effects of increasing concentrations of PPB (open circles). C) Normalized concentration-response relationship of the effect of PPB on the firing frequency. Data were fitted using Hill equation, resulting in  $IC_{50} = 127.3$   $\mu$ M.

protocol, randomly caused bursts of unclamped action currents in some pyramidal cells. Thus, we also evaluated the effects of PPB on the ramp-evoked putative inward sodium currents. As illustrated in Fig. 3D, bath perfusion of PPB (500  $\mu\text{M}$ ) blocked both the persistent as well as the unclamped action currents, suggesting that PPB can also block the action potentials on pyramidal cells. PPB decreased the mean frequency of the action current burst (Control =  $32.25 \pm 3.9$  Hz; in the presence of PPB:  $0.74 \pm 0.5$  Hz;  $n = 7$ ;  $p < 0.001$ ) and caused a total suppression of unclamped action potential-mediated currents in 5 of 7 cells (Fig. 3E).

### 3.3. PPB inhibits the sustained firing of action potentials

In the next set of experiments, we tested whether PPB blocks action potential generation, and alters the fire frequency of pyramidal neurons. To examine this, the cells were held in current clamp at  $-65$  mV and current steps (0–450 pA in 50 pA steps; 1 s duration at 0.2 Hz) were applied. In control condition, pyramidal cells fired trains of action potentials that reached a mean frequency of  $27.04 \pm 1.5$  Hz with the injection of 450 pA (Fig. 4B). Increasing concentrations of PPB (200, 500 or 1000  $\mu\text{M}$ ), effectively reduced and suppressed the generation of APs, as summarized in Fig. 4. At the highest PPB concentration tested (1000  $\mu\text{M}$ ) the AP occurrence was totally abolished ( $p < 0.001$ ;  $n = 5$ ) (Figs. 4A3, B and Table 1). Next, we determined the half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) at which PPB block action potential generation by constructing a concentration-response curve. The firing frequency was normalized to the response obtained with 450 pA and was plotted as a function of drug concentration. The plot was well fitted ( $r^2 = 0.972$ ) to the sigmoid curve derived from the Hill equation and provided a PPB  $\text{IC}_{50} = 127.3$   $\mu\text{M}$  (Fig. 4C;  $n = 45$ ). PPB also increased the required current to elicit action potentials (rheobase current); thus, in control condition at  $V_m = -65$  mV, the mean rheobase was  $158.8 \pm 8.1$  pA; perfusion of PPB caused a concentration-dependent increase of the rheobase current. The changes in the rheobase current in the presence of PPB are summarized in Table 2.

### 3.4. Intracellular dialysis of PPB has no effects on the fire frequency of pyramidal cells

It is well known that antiepileptic drugs that block sodium channels interact on specific sites of the  $\text{Na}^+$  channel. Thus, phenytoin, carbamazepine or lamotrigine act on the extracellular side of the membrane and have no effect when applied intracellularly (Kuo, 1998). To determine the site of action of PPB, the patch pipettes were filled with an internal solution containing PPB 200  $\mu\text{M}$  ( $n = 8$ ). The intracellular diffusion of PPB

(for at least 15 min before the beginning of the experiment) did not alter the resting membrane potential, firing frequency or AP waveform (Fig. 5B, C). Nevertheless, when PPB was subsequently added to the bath perfusion, the PPB-loaded cells exhibited a significant decrease in the firing frequency (mean firing frequency of CA1 cells dialyzed with 200  $\mu\text{M}$  PPB =  $29.6 \pm 2.5$  Hz; firing frequency in the presence of external PPB =  $12.3 \pm 2.1$  Hz;  $n = 8$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 5A–D), indicating that PPB acts through the extracellular surface of the cellular membrane.

### 3.5. PPB modifies the action potential kinetics

In the next set of experiments, we determined the effects of PPB on the kinetic properties of the action potential waveforms. In control condition, the AP waveform had a threshold of  $-39.9 \pm 0.8$  mV; reached a maximal voltage peak of  $85.8 \pm 1$  mV, half-width of  $1.6 \pm 0.1$  ms, maximal rise slope of  $134 \pm 4$  mV/ms and maximal decay slope of  $-60 \pm 2.6$  mV/ms. When PPB (200  $\mu\text{M}$ ) was externally applied ( $n = 11$ ), it caused a significant decrease in the AP amplitude ( $76.8 \pm 2.3$  mV;  $P < 0.05$ ) and increased both AP threshold ( $-26.7 \pm 2.9$  mV;  $P < 0.05$ ) and AP half-width ( $3.6 \pm 1.2$  ms;  $P < 0.05$ ; Fig. 6A–F).

From the evoked trains on the preceding figures (Right panels in Fig. 4A1 and Fig. 5A) it was evident that PPB caused a sustained reduction in the amplitude of the AP spikes and increase in the AP threshold (Fig. 6B). This observation was further confirmed by analyzing the individual phase plots of consecutive APs elicited during a 1 s, depolarizing pulse in control and in the presence of PPB (Fig. 6, panels G1 and H1). In control, the AP plots shows a stable depolarizing and repolarizing phase (Fig. 6G2), consistent amplitude and AP threshold (Fig. 6G3). By contrast, in the presence of PPB, a dramatic decrease in rising, decay, amplitude and threshold was observed, as illustrated in Fig. 6H1–H3. In addition to Fig. 6, Table 1 summarizes the effects of PPB on the AP waveform properties.

### 3.6. Propylparaben modifies the passive properties of CA1 pyramidal cells

Lastly, we explored the effects of different concentrations of PPB (5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  and 1000  $\mu\text{M}$ ) on the passive properties of pyramidal cells.  $R_N$  was measured as the slope of the linear portion of the I–V plot (see methods for further details). The initial  $R_N$  value of CA1 pyramidal cells was  $103.1 \pm 3.4$   $\text{M}\Omega$  ( $n = 45$ ). Increasing concentrations of PPB caused a significant  $R_N$  reduction in a concentration-dependent manner (Fig. 7B–D). The magnitude of change in  $R_N$  induced by different concentrations of PPB is summarized in Table 2. We also examined the effects of PPB on the membrane time constant ( $\tau_m$ ), and similar to  $R_N$ ,  $\tau_m$  was sensitive to PPB in a concentration-dependent manner from 200  $\mu\text{M}$  onwards (Fig. 7E). Lastly, we assessed the effects of PPB on the hyperpolarization-activated sag and its rebound amplitude, components mediated by the  $I_h$  channels. However, neither of these parameters were modified by PPB (Fig. 7F and G).

## 4. Discussion

We provided experimental evidence that PPB, a *p*-hydroxybenzoic acid ester widely used as a preservative in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries also decreases the excitability of hippocampal neurons. Although these preservatives, including PPB, has been banned as a food additive in Europe (EFSA, 2004); the human exposure to parabens in the environmental, cosmetic, commodities and food (Eriksson et al., 2008; Olmo et al., 2015; Yamamoto et al., 2011) do not represent a major threat to human health (Casas et al., 2011; CDC, 2015; Kang et al., 2016). Our

**Table 1**

Comparison of action potential properties of CA1 pyramidal neurons in control versus PPB 200 and 500  $\mu\text{M}$ .

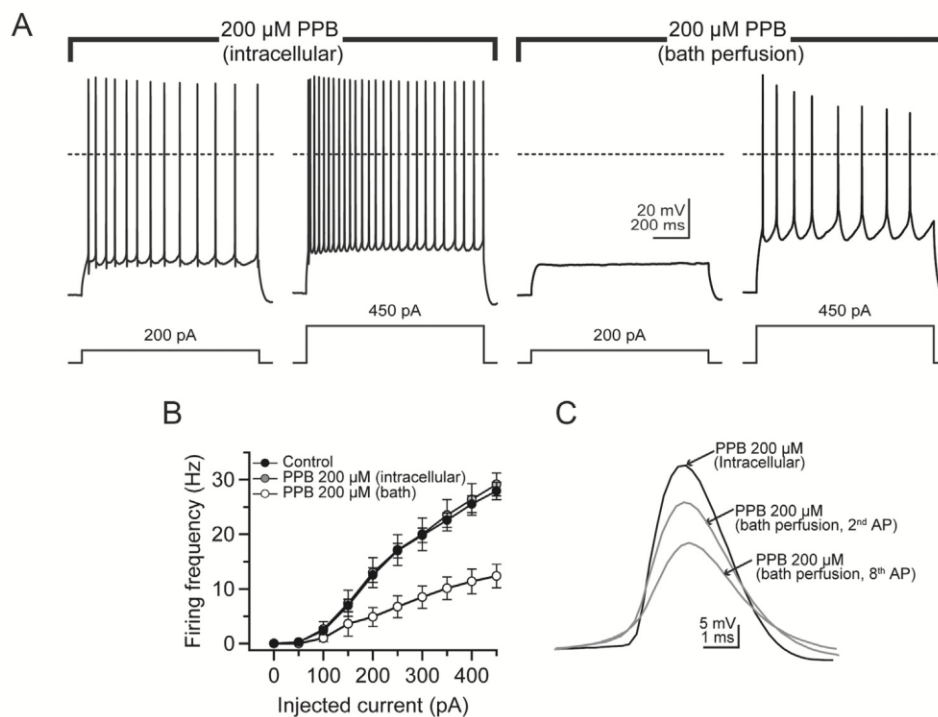
	Control	PPB 200 $\mu\text{M}$ ( $n = 11$ )	PPB 500 $\mu\text{M}$ ( $n = 8$ )
	(I = Rheobase)		
AP amplitude (mV)	$85.8 \pm 1$	$76.8 \pm 2.3^*$	N/A
AP Threshold	$-39.9 \pm 0.8$	$-26.7 \pm 2.9^{**}$	N/A
Half-width (ms)	$1.6 \pm 0.1$	$3.6 \pm 1.2^{**}$	N/A
Max Rise slope (mV/ms)	$134 \pm 4$	$93.2 \pm 15^{**}$	N/A
Max Decay Slope (mV/ms)	$-60 \pm 2.6$	$-42 \pm 11^{**}$	N/A
	(I = 2X Rheobase)		
AP amplitude (mV)	$78.7 \pm 1$	$67.8 \pm 2.5^{**}$	$50.8 \pm 9^*$
Half-width (ms)	$2.1 \pm 0.2$	$6.1 \pm 2^{***}$	$12.6 \pm 2^{**}$
Max Rise slope (mV/ms)	$119 \pm 5.1$	$64.1 \pm 11^{***}$	$17.1 \pm 8^*$
Max Decay Slope (mV/ms)	$-46.4 \pm 3$	$-27.4 \pm 10^{**}$	$-3.6 \pm 0.3^*$

All values are mean  $\pm$  SE. N/A: Not Applicable, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to control.

**Table 2**

Comparison of passive membrane properties of CA1 pyramidal neurons in control and in the presence of increasing concentrations of PPB.

	Control (n = 45)	5 $\mu\text{M}$ (n = 6)	50 $\mu\text{M}$ (n = 8)	100 $\mu\text{M}$ (n = 7)	200 $\mu\text{M}$ (n = 11)	500 $\mu\text{M}$ (n = 8)	1000 $\mu\text{M}$ (n = 5)
$V_m$ (mV)	$-65.2 \pm 0.6$	$-67.2 \pm 1.1$	$-67.1 \pm 1.7$	$-64.7 \pm 0.5$	$-65.7 \pm 0.6$	$-65.6 \pm 0.7$	$-65 \pm 0$
$R_N$ ( $M\Omega$ )	$105.7 \pm 5.2$	$104.1 \pm 8.6$	$95.8 \pm 9.7$	$116.4 \pm 4.1$	$98.6 \pm 18^*$	$91.6 \pm 9^{**}$	$80.1 \pm 12^{**}$
Membrane Time Constant (ms)	$25.1 \pm 0.6$	$25.1 \pm 1.5$	$24.1 \pm 1.5$	$23.9 \pm 2.1$	$19.3 \pm 1.3^*$	$19.9 \pm 1.5^*$	$19.5 \pm 1.0^*$
sag (%)	$6.34 \pm 0.27$	$7.49 \pm 1.01$	$5.96 \pm 0.83$	$6.04 \pm 0.91$	$6.95 \pm 0.65$	$5.68 \pm 0.57$	$6.11 \pm 0.35$
rheobase (pA)	$158 \pm 8.1$	$158 \pm 24$	$206 \pm 17$	$207 \pm 22^*$	$227 \pm 33^{**}$	$350 \pm 57^{***}$	N/A
Mean fire frequency (Hz)	$27.04 \pm 1.5$	$24.5 \pm 4$	$16.5 \pm 2^{**}$	$15.4 \pm 2^{**}$	$6 \pm 1.6^{***}$	$2.7 \pm 1^{***}$	$0^{***}$

All values are mean  $\pm$  SE. N/A: Not Applicable, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to control.

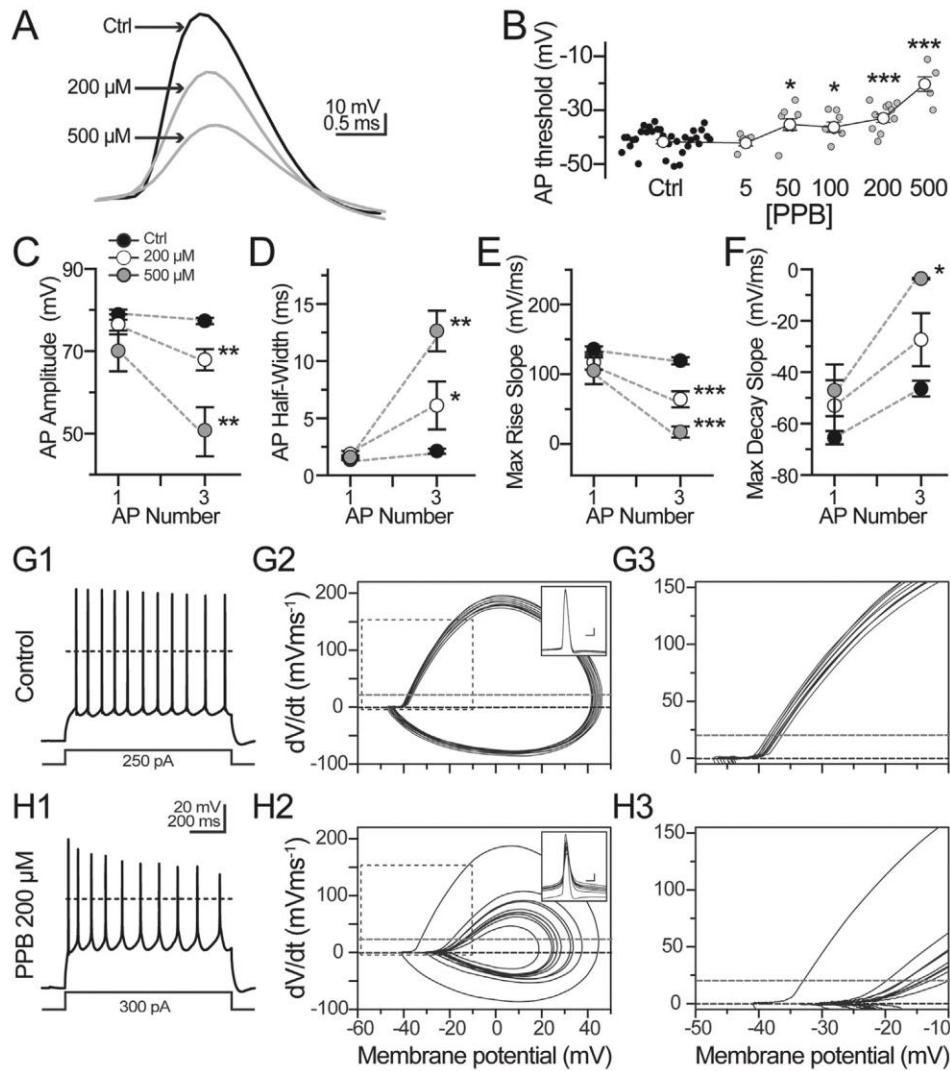
**Fig. 5.** Intracellular dialysis of PPB has no effect on the firing frequency or AP kinetics A) AP trains obtained from cells loaded with PPB (200  $\mu\text{M}$ ). The intracellular dialysis of PPB has no effect on the action potential fire frequency. The subsequent perfusion of PPB reduced the AP generation. B) Scatter plot summarizing the changes on the fire frequency of the cells internally loaded with PPB (filled circles) and the subsequent effect of bath application of PPB (empty circles). The responses were elicited by current injections from 0 to 450 pA in 50 pA increments. C) Representative AP waveforms showing the lack of effect of intracellular dialysis of PPB. The superimposed grey traces are APs from the same cell after the bath perfusion of PPB.

study provides electrophysiological evidences of the effects of PPB on mammalian neurons.

Previous reports have demonstrated that parabens modulate calcium and potassium channels in peripheral neurons (Inoue et al., 1994) and sodium currents of cultured cardiomyocytes (Ji et al., 2004). Here, we demonstrated that PPB effectively blocks the fast-inactivating as well as the persistent sodium currents and slows the recovery kinetics that follows the action potential generation. Also, PPB decreases the intrinsic excitability of CA1 hippocampal neurons in a concentration-dependent manner and causes a reduction in the input resistance and membrane time constant, shunting the current required for action potential generation. The latter changes suggest that PPB might also increase or activate membrane conductances active near the resting membrane potential of CA1 cells, an observation that requires further investigation.

Instead, our study focused on the effects that PPB has on the firing rate of excitable neurons of the hippocampus. PPB decreased

the neuronal excitability by a mechanism that resembles the action of antiepileptic drugs and local anesthetics, reducing the repetitive firing of action potentials by slowing the sodium channel recovery and exerting a use-dependent block (Hille, 1977). For instance, the inhibition exerted by the anticonvulsants lamotrigine, phenytoin, and carbamazepine, occurs when these drugs binds to the  $\text{Na}^+$  channel during the inactivated state and produce use-dependent inhibition (Colombo et al., 2013; Kuo, 1998; Lang et al., 1993; Willow et al., 1985). This mechanism has been proposed to be responsible for the protection against partial and generalized tonic-clonic seizures (Rogawski and Löscher, 2004). The higher concentrations of PPB tested in this study (500–1000  $\mu\text{M}$ ) resulted in a tonic block of the sodium currents (Ragsdale et al., 1991) and use-dependent block of action potentials (200  $\mu\text{M}$ ), thereby restraining the amount of sodium channels available for repetitive firing and prolonging the refractory period (Courtney, 1975; Hille, 1977). The PPB  $\text{IC}_{50}$  determined for AP inhibition was 127.3  $\mu\text{M}$  (Fig. 4C). Noteworthy, this value matches with the brain tissue



**Fig. 6.** PPB modifies the action potential kinetics and acts in a use-dependent manner. A) AP waveforms obtained from the same cell in control and in the presence of increasing concentrations of PPB (gray traces). B) Scatter Plot summarizing the changes in the AP threshold induced by PPB at different PPB concentrations. Each filled circle represents the threshold of an individual cell in control, whereas the gray circles represent the AP threshold in the presence of the indicated PPB concentration. C–F) Changes in the AP kinetic parameters: amplitude, half-width, maximal rise slope and maximal decay slope induced with bath perfusion of PPB. For all the plots, the filled circles represent the AP kinetic values in control condition measuring three continuous AP elicited with a 200 pA current step at  $-65$  mV and the changes elicited by the application of 200 or 500  $\mu$ M of PPB. G1, H1) Representative AP train elicited with a 1000 ms depolarizing pulse in control (G1) and in the presence of PPB (H1). G2) Phase plot generated from the APs shown in G1. The inset shows the individual superimposed APs waveforms used to construct the phase plot. G3) Magnification of the AP threshold and initiation obtained from the dotted box in G2. In control, the rise slope and threshold of the APs was consistent among individual events. H1–H3) Traces from the same pyramidal cell following 10 min of PPB perfusion. The voltage trace in the left panel shows the use-dependent decrease of the APs amplitude and the trajectory corresponding to AP polarization rate. The reduction of both parameters is evidenced in the phase plots. The cumulative effect of PPB on the successive amplitude and rise slope of the APs is shown in the magnification. The decrease in both parameters indicates the use-dependent effect of PPB. The horizontal gray dashed lines at 20 mV/ms identifies the AP threshold. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Calibration bars in the inset of G2 and H2: 1.5 ms and 10 mV.

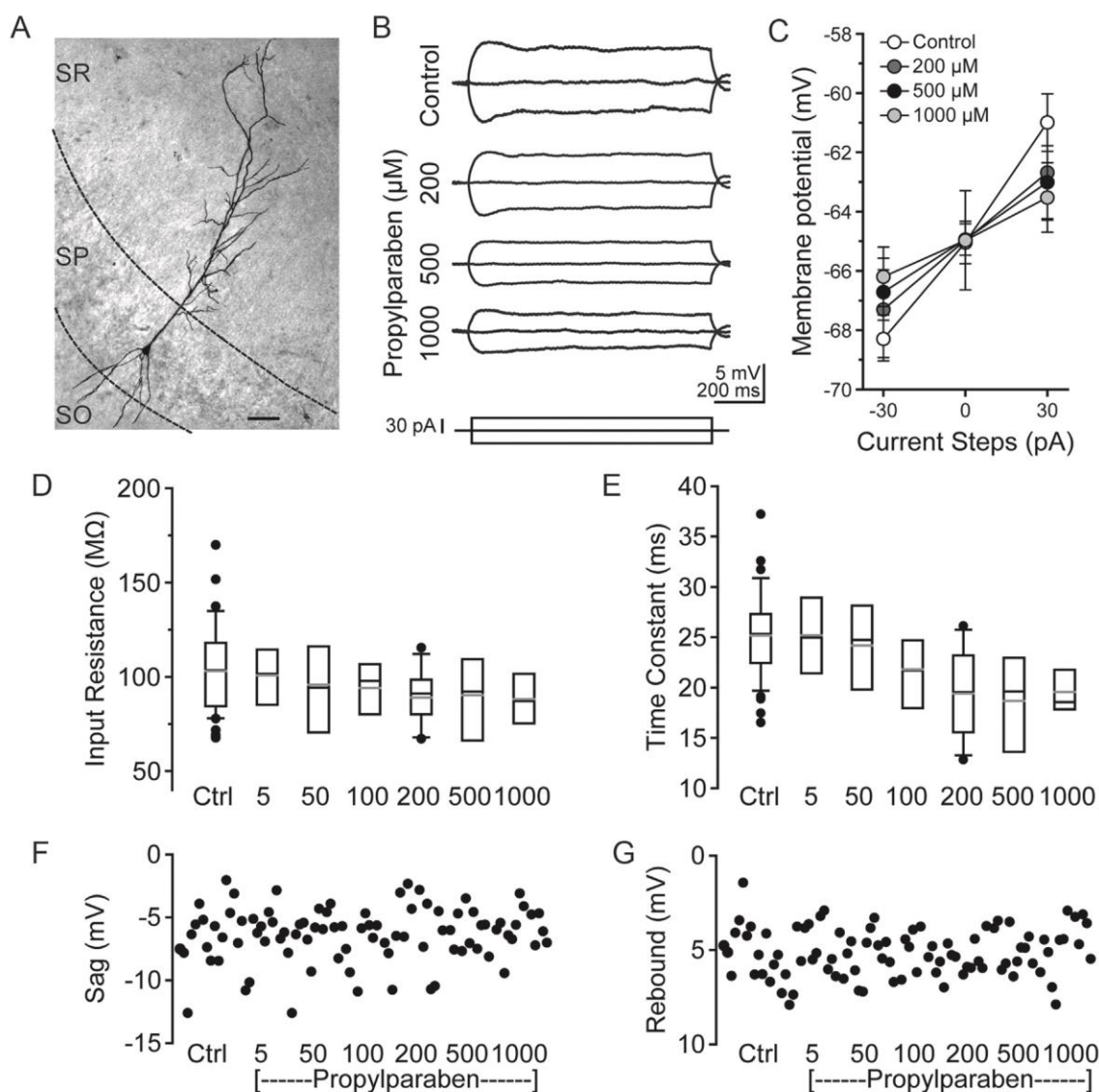
concentration of PPB found in dogs (127.6  $\mu$ M), when this compound was intravenously administered at a total dose of 100 mg/kg (Jones et al., 1956).

Moreover, our experiments indicate that the main effect of PPB was a slowing of the transition from inactivated to recovered state of the sodium channel. Thus, in control condition, a large proportion of the sodium current ( $\geq 80\%$ ) was available within the first 15 ms (Fig. 2D). This time-course was reliably fitted with a monoexponential function. Conversely, PPB exposure substantially increased the delay from inactivation, as  $\leq 30\%$  of the sodium current was available within the same range of time, indicating a lag in the onset of the recovery (Kuo and Bean, 1994). The PPB action on the recovery rate resembles the time-course exhibited by the sodium blocker phenytoin, suggesting that PPB might induce a conformational change that interferes with the inactivation

particle (Kuo and Bean, 1994) or the voltage sensor of the sodium channel (Capes et al., 2013).

Furthermore, PPB enhanced the steady-state inactivation, a kinetic state that also explains the reduction in excitability (Schwarz and Grigat, 1989). In our study, the steady-state inactivation was evidenced by a hyperpolarizing shift of the inactivation curve. As a minimal proportion of sodium channels (less than 5%) were available to participate in AP generation, this might explain the increase in the rheobase current required to elicit APs, suggesting that PPB limit the amount of sodium channels available to open.

In addition to the fast inactivation of sodium channels responsible for the AP generation, pyramidal cells also express a slow, persistent sodium current that activates near the firing threshold (French et al., 1990). This current is involved in the amplification of subthreshold oscillations and synaptic responses;



**Fig. 7.** Subthreshold modulation of membrane properties of CA1 pyramidal cells by PPB. A) Typical biocytin-filled (0.15%) cell included in the study, depicting the characteristic triangular soma and dendrites orientation of CA1 pyramidal neurons. B) Voltage responses to somatic DC injection (30 pA steps; 1000 ms) in control and in the presence of PPB. C) Averaged I–V curves in control (open circles) and at the indicated PPB concentrations. D, E) Box plots summarizing the changes in  $R_N$  and time constant to increasing concentrations of PPB and F, G) Scatter plots showing the lack of modulatory effect of PPB on the  $I_h$ -mediated voltage sag and rebound depolarization.

spike facilitation, and repetitive firing (Somjen and Muller, 2000; Vervaeke et al., 2006; Yue, 2005). As the pathophysiological hyperexcitability observed in several forms of epilepsy is associated with an increase in the  $I_{NaP}$  (Estacion et al., 2010; Lossin et al., 2002; Rhodes et al., 2004), modulation of this conductance has been considered as a potential target to control the neuronal hyperexcitability (Ragsdale, 2008; Stafstrom, 2007). Moreover, several antiepileptic drugs including the anticonvulsant phenytoin decreases the neuronal excitability by blocking the persistent sodium current (Chao and Alzheimer, 1995; Lampl et al., 1998). Notably, PPB effectively acted on both the persistent and the fast sodium current to decrease the neuronal excitability of pyramidal cells, a mechanism that might explain its anticonvulsant (Talevi et al., 2007), cardio and neuroprotective effects (Santana-Gómez et al., in progress; Ji et al., 2004).

PPB caused a sustained reduction in the action potential amplitude and maximal rate of rising, a modulatory effect that also resembles the mechanism by which phenytoin blocks repetitive

firing (Lampl et al., 1998). A reduction in the AP amplitude and maximal rate of rising are also indicative of a reduction in the total inward sodium current mediated by voltage-gated sodium channels (Capek and Esplin, 1994; McLean and Macdonald, 1986); whereas the preferential inhibition of the late phase of the current-evoked action potentials, suggest that PPB acts in a use-dependent manner (Calabresi et al., 1999). Additionally, the recovery time course elicited with PPB is sufficient for the use-dependent block (Quan et al., 1996). It is noteworthy that neurons internally dialyzed with PPB exhibited unchanged AP waveforms, kinetics, and firing frequency. Coincidentally, similar effects on sodium currents have been reported for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine, as these drugs can only exert their pharmacological activity when applied on the external side of the cellular membranes (Jo and Bean, 2014; Kuo, 1998). Therefore, our data indicates that the pharmacological action of PPB on central neurons responsible for the reduction of excitability occurs on the extracellular side of the membrane.

A drawback of the study of isolated currents in neurons in acute slices is that the somatic voltage clamp does not completely control them, as the voltage-gated currents occurring throughout the dendritic trees and axonal shaft contribute to the current recorded on the soma (Bar-Yehuda and Korngreen, 2008; Williams and Mitchell, 2008). On the other hand, isolated neurons are exposed to an aggressive enzymatic and mechanical treatment that trims axons and dendrites and thus permits improved clamping of the current recorded. Nevertheless, we decided to assess the effect of PPB on the sodium currents from neurons maintained in a less disruptive environment, namely the brain slice, as a previous report demonstrated that sodium currents of pyramidal cells in brain slices share kinetic and pharmacological similarities to those recorded on isolated neurons (Somjen and Muller, 2000). Our data show that PPB decreases the sodium current amplitude that ultimately leads to a reduction in the repetitive firing of action potentials, yielding an overall decrease in neuronal excitability. In addition to the cardioprotective effects reported for PPB (Ji et al., 2004), our results suggest that PPB exerts anti-convulsant (Talevi et al., 2007) and neuroprotective actions. Moreover, we have experimental evidence that PPB suppresses the high-frequency discharge of action potentials induced with 4-Aminopyridine in a  $Mg^{2+}$ -free ACSF, a well-known model of epileptiform activity (Lara-Valderrábano et al., in progress). The latter observation supports the virtual screening analysis reported by Talevi et al. (2007) that predicted sodium blockade and anticonvulsant activity of PPB.

In summary, we have demonstrated that PPB, an alkyl ester of *p*-hydroxybenzoic acid commonly used as an antimicrobial preservative, effectively blocks the sodium channels responsible for the action potential generation. The blockade exerted by PPB leads to an overall decrease in the intrinsic excitability of hippocampal neurons suggesting inhibition of network excitability. Our data also indicate that PPB modulates other voltage-gated channels involved in neuronal excitability, a notion that requires further studies.

## Acknowledgements

The experiments were performed at Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN, Sede Sur (Cinvestav Sur) México City. E.J.G. was funded by CONACyT–Mexico CB-2011-01-166241 and INFR-2012-01-187757; L.L.V. was supported by CONACyT scholarship 243422.

## References

- Aalto, T., Firman, M., Rigler, N., 1953. *p*-hydroxybenzoic acid esters as preservatives. I. Uses, antibacterial and antifungal studies, properties and determination. *J. Am. Pharm. Assoc.* 44, 9–457.
- Błędzka, D., Gromadzińska, J., Wąsowicz, W., 2014. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ. Int.* 67, 27–42.
- Bar-Yehuda, D., Korngreen, A., 2008. Space-clamp problems when voltage clamping neurons expressing voltage-gated conductances. *J. Neurophysiol.* 99, 1127–1136.
- Bredin, J., Davin-Régli, A., Pagès, J.-M., 2005. Propyl paraben induces potassium efflux in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 1013–1015.
- CDC, 2015. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta.
- Calabresi, P., Centonze, D., Marfia, G., Pisani, A., Bernardi, G., 1999. An *in vitro* electrophysiological study on the effects of phenytoin, lamotrigine and gabapentin on striatal neurons. *Br. J. Pharmacol.* 126, 689–696.
- Capek, R., Esplin, B., 1994. Effects of lidocaine on hippocampal pyramidal cells: depression of repetitive firing. *Neuroreport* 5, 681–684.
- Capes, D.L., Goldschen-Ohm, M.P., Arcisio-Miranda, M., Bezanilla, F., Chanda, B., 2013. Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels. *J. Gen. Physiol.* 142, 101–112.
- Casas, L., Fernández, M.F., Llop, S., Guxens, M., Ballester, F., Olea, N., Irurzun, M.B., Rodríguez, L.S.M., Riaño, I., Tardón, A., Vrijheid, M., Calafat, A.M., Sunyer, J., 2011. Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of Spanish pregnant women and children. *Environ. Int.* 37, 858–866.
- Chao, T.I., Alzheimer, C., 1995. Do neurons from rat neostriatum express both a TTX-sensitive and a TTX insensitive slow  $Na^{+}$ -current. *J. Neurophysiol.* 74, 934–941.
- Chen, J., Ahn, K.C., Gee, N.A., Gee, S.J., Hammock, B.D., Lasley, B.L., 2007. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221, 278–284.
- Colombo, E., Franceschetti, S., Avanzini, G., Mantegazza, M., 2013. Phenytoin inhibits the persistent sodium current in neocortical neurons by modifying its inactivation properties. *PLoS One* 8.
- Courtney, K.R., 1975. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195, 225–236.
- EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to para hydroxybenzoates (E 214–219). *EFSA J.* 2, 1–44.
- Eriksson, E., Andersen, H.R., Ledin, A., 2008. Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities. *J. Hazard. Mater.* 156, 240–259.
- Estacion, M., Gasser, A., Dib-Hajj, S.D., Waxman, S.G., 2010. A sodium channel mutation linked to epilepsy increases ramp and persistent current of Nav1.3 and induces hyperexcitability in hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* 224, 362–368.
- Final Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, and Butylparaben, 1984. *Int. J. Toxicol.* 3, 147–209.
- French, C.R., Sah, P., Bucketr, K.J., Gage, P.W., Curtin, J., 1990. A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *J. Gen. Physiol.* 0, 1139–1157.
- Hille, B., 1977. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J. Gen. Physiol.* 69, 497–515.
- Inoue, K., Nakazawa, K., Inoue, K., Fujimori, K., Takanaka, A., 1994. Modulation by alkyl *p*-hydroxybenzoates of voltage- and ligand-gated channels in peripheral neuronal cells. *Neuropharmacology* 33, 891–896.
- Ji, X., Xu, Z., Criswell, H.E., Boysen, P.G., 2004. Propyl paraben inhibits voltage-dependent sodium channels and protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 74, 3043–3052.
- Jo, S., Bean, B.P., 2014. Sidedness of carbamazepine accessibility to voltage-gated sodium channels. *Mol. Pharmacol.* 85, 381–387.
- Jones, P.S., Thigpen, D., Morrison, J.L., Richardson, A.P., 1956. *p*-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives III: The physiological disposition of *p*-Hydroxybenzoic acid and its esters. *J. Am. Pharm. Assoc.* 45, 268–273.
- Kang, H.S., Kyung, M.S., Ko, A., Park, J.H., Hwang, M.S., Kwon, J.E., Suh, J.H., Lee, H.S., Moon, G.I., Hong, J.H., Hwang, I.G., 2016. Urinary concentrations of parabens and their association with demographic factors: a population-based cross-sectional study. *Environ. Res.* 146, 245–251.
- Kitamura, Y., 1979. Effects of local anaesthetics on the peripheral nerve and the spinal cord. *Osaka City Med. Journal.* 25, 7–24.
- Kuo, C.C., Bean, B.P., 1994.  $Na^{+}$  channels must deactivate to recover from inactivation. *Neuron* 12, 819–829.
- Kuo, C.-C., 1998. A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal  $Na^{+}$  channels. *Mol. Pharmacol.* 54, 712–721.
- Lampl, I., Schwandt, P., Crill, W., 1998. Reduction of cortical pyramidal neuron excitability by the action of phenytoin on persistent  $Na^{+}$  current. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 228–237.
- Lang, D.G., Wang, C.M., Cooper, B.R., 1993. Lamotrigine, phenytoin and carbamazepine interactions on the sodium current present in N4TG1 mouse neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266, 829–835.
- Lossin, C., Wang, D.W., Rhodes, T.H., Vanoye, C.G., George, A.L., 2002. Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* 34, 877–884.
- Matthews, C., Davidson, J., Bauer, E., Morrison, J.L., Richardson, A.P., 1956. *p*-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. II. Acute and chronic toxicity in dogs, rats, and mice. *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. (Baltim.)* 45, 260–267.
- McLean, M.J., Macdonald, R.L., 1986. Sodium valproate, but not ethosuximide, produces use- and voltage-dependent limitation of high frequency repetitive firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237, 1001–1011.
- Nguyen, T., Clare, B., Guo, W., Martinac, B., 2005. The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*. *Eur. Biophys. J.* 34, 389–395.
- Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M., 2015. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: uses, exposure and controversy 8398, 0–86.
- Park, Y.Y., Johnston, D., Gray, R., 2013. Slowly inactivating component of  $Na^{+}$  current in peri-somatic region of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 109, 1378–1390.
- Quan, C., Mok, W.M., Wang, G.K., 1996. Use-dependent inhibition of  $Na^{+}$  currents by benzocaine homologs. *Biophys. J.* 70, 194–201.
- Ragsdale, D.S., Scheuer, T., Catterall, W.A., 1991. Frequency and voltage-dependent inhibition of type IIA  $Na^{+}$  channels expressed in a mammalian cell line, by local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant drugs. *Mol. Pharmacol.* 40, 756–765.
- Ragsdale, D.S., 2008. How do mutant Nav1.1 sodium channels cause epilepsy? *Brain Res. Rev.* 58, 149–159.
- Rhodes, T.H., Lossin, C., Vanoye, C.G., Wang, D.W., George, A.L., 2004. 2004: Noninactivating voltage-gated sodium channels in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 1114, 11147–11152.
- Rogawski, M., Löscher, W., 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 553–564.



- Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P., 1998. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, 12–19.
- Schwarz, J.R., Grigat, G., 1989. Phenytoin and carbamazepine: potential- and frequency-dependent block of {Na} currents in mammalian myelinated nerve fibers. *Epilepsia* 30, 286–294.
- Somjen, G.G., Muller, M., 2000. Potassium-induced enhancement of persistent inward current in hippocampal neurons in isolation and in tissue slices. *Brain Res.* 885, 102–110.
- Soni, M.G., Burdock, G. a., Taylor, S.L., Greenberg, N. a., 2001. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem. Toxicol.* 39, 513–532.
- Stafstrom, C.E., 2007. Persistent sodium current and its role in epilepsy. *Epilepsy Curr.* 7, 15–22.
- Talevi, A., Bellera, C.L., Castro, E.A., Bruno-Blanch, L.E., 2007. A successful virtual screening application: prediction of anticonvulsant activity in MES test of widely used pharmaceutical and food preservatives methylparaben and propylparaben. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 21, 527–538.
- Tamagnini, F., Scullion, S., Brown, J.T., Randall, A.D., 2015. Intrinsic excitability changes induced by acute treatment of hippocampal CA1 pyramidal neurons with exogenous amyloid  $\beta$  peptide. *Hippocampus* 25 (July (7)), 786–797.
- Tavares, R.S., Martins, F.C., Oliveira, P.J., Ramalho-Santos, J., Peixoto, F.P., 2009. Parabens in male infertility—is there a mitochondrial connection? *Reprod. Toxicol.* 27, 1–7.
- Urbani, A., Belluzzi, O., 2000. Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3567–3574.
- Vervaeke, K., Hu, H., Graham, L.J., Storm, J.F., 2006. Contrasting effects of the persistent Na<sup>+</sup> current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron* 49, 257–270.
- Williams, S.R., Mitchell, S.J., 2008. Direct measurement of somatic voltage clamp errors in central neurons. *Nat. Neurosci.* 11, 790–798.
- Willow, M., Gonoï, T., Catterall, W.a., 1985. Voltage clamp analysis of the inhibitory actions of diphenylhydantoin and carbamazepine on voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* 27, 549–558.
- Yamada-Hanff, J., Bean, B.P., 2013. Persistent sodium current drives conditional pacemaking in CA1 pyramidal neurons under muscarinic stimulation. *J. Neurosci.* 33, 15011–15021.
- Yamamoto, H., Tamura, I., Hirata, Y., Kato, J., Kagota, K., Katsuki, S., Yamamoto, A., Kagami, Y., Tatarazako, N., 2011. Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: individual and additive approach. *Sci. Total Environ.* 410–411, 102–111.
- Yue, C., 2005. Proximal persistent Na<sup>+</sup> channels drive spike afterdepolarizations and associated bursting in adult CA1 pyramidal cells. *J. Neurosci.* 25, 9704–9720.
- Zhang, Y., Zhao, J., Zhang, T., Yang, Z., 2010. In vitro assessment of the effect of methylene blue on voltage-gated sodium channels and action potentials in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neurotoxicology* 31, 724–729.