

03062  
4  
2rj-

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE**  
**POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**\* PARTICIPACION DE LOS RECEPTORES A GLUTAMATO DEL TIPO  
NMDA EN LA ACTIVIDAD EPILEPTICA INDUCIDA POR ADMINISTRACION  
INTRAHIPOCAMPICA E INTRAPERITONEAL DE 4-AMINOPIRIDINA \***

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TRABAJO DE TESIS QUE PRESENTA EL BILOGO**

**JORGE LUCIO FRAGOSO-VELOZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN INVESTIGACION**  
**BIOMEDICA BASICA (AREA NEUROCIENCIAS)**

**MEXICO, D.F., ABRIL DE 1992.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	pág.
I. RESUMEN .....	8
II. INTRODUCCION	
A. EPILEPSIA .....	12
B. LA 4-AMINOPIRIDINA	
1. Generalidades .....	14
2. Efectos <i>in vitro</i> .....	15
3. Efectos <i>in vivo</i> .....	16
4. Usos y aplicaciones clinicas .....	17
C. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISION	
1. Transmision GABAergica .....	18
2. Neurotransmision excitadora	
a. Generalidades .....	19
b. Receptores a aminoacidos excitadores .....	20
c. Los receptores tipo no-NMDA .....	23
d. El receptor tipo NMDA .....	24
e. El receptor NMDA y la epilepsia .....	26
D. LAS DIHIDROPIRIDINAS .....	31
III. OBJETIVO .....	34
IV. MATERIALES Y METODOS .....	36
V. ARTICULO ENVIADO PARA PUBLICACION .....	38
VI. DISCUSION GENERAL	
1. Efecto protector de los antagonistas de NMDA ...	63
2. Efecto de la 4-AP sobre las corrientes de calcio postsinapticas .....	64
3. Efecto potenciador de las dihidropiridinas .....	65
4. Modelo propuesto .....	67
VII. REFERENCIAS .....	70

## I. RESUMEN

La 4-aminopiridina (4-AP), un bloqueador de los canales de potasio, es una droga usada frecuentemente en neurobiología, por ejemplo como modelo de epilepsia experimental, sin embargo, el mecanismo de acción por el cual produce su actividad convulsiva no es muy claro.

En los años recientes se ha demostrado que en la neurotransmisión mediada por aminoácidos excitadores (AAE) participan diferentes tipos de receptores que, de manera general, se clasifican en los que son sensibles a N-metil-D-aspartato (receptores tipo NMDA) y los que no lo son (receptores tipo no NMDA). Se ha demostrado que los receptores tipo NMDA participan en los mecanismos de generación y propagación de actividad convulsiva ya que poseen un efecto protector contra las convulsiones inducidas en diversos modelos experimentales de epilepsia.

En un trabajo previo demostramos que la administración intrahipocámpica (i.h.) de 4-AP induce convulsiones límbicas y sacudidas de perro mojado (SPM) mientras que su administración intraperitoneal (i.p.) provoca mioclonias convulsiones tónico-clónico generalizadas (CTCG) (Fragoso-Veloz et al., 1990).

El presente trabajo está encaminado a profundizar el estudio de los mecanismo que intervienen en la generación y propagación de la actividad convulsiva inducida por la administración i.p. e i.h. de 4-AP, para lo cual se estudió el efecto de antagonistas de los receptores a AAE sobre las CTCG y las SPM inducidas por la 4-AP.

Los resultados obtenidos muestran que los antagonistas de los receptores tipo NMDA son capaces de antagonizar tanto las SPM como las CTCG inducidas por la 4-AP, sin embargo los antagonistas de receptores tipo no NMDA no tuvieron ningun efecto sobre dicha actividad convulsiva. Dichos resultados sugieren que los AAE, a través de los receptores sensibles a NMDA, intervienen en el mecanismo de generación de la actividad convulsiva inducida por la 4-AP, lo cual indica que una sobreexcitación neuronal mediada por los AAE es fundamental para que se produzcan las convulsiones.

Se discuten los resultados obtenidos y se propone un modelo general que puede explicar los resultados obtenidos.

## II. INTRODUCCION

## A. EPILEPSIA

Etimologicamente, la palabra epilepsia deriva del griego epilambanein que significa "ser sobrecogido bruscamente", "ser atacado" o "algo que cae subitamente sobre el individuo". La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más comunes en la población humana. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que la incidencia de este padecimiento, a nivel mundial, es del 1% y el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía estima que en nuestro país el porcentaje es similar.

El primer estudio sobre epilepsia se debe a Hipócrates y se tituló "La enfermedad sagrada", donde establece que la enfermedad se localiza en el cerebro, sin embargo sus conclusiones se alteraron por supersticiones y por que se le adjudicaron factores sobrenaturales. Actualmente la OMS en su diccionario de epilepsia publicado en 1973 define a la epilepsia de la siguiente manera: "Afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes, que se deben a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epiléptica) asociada con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas". Algunos de los factores que determinan la posibilidad de que alguna población neuronal tienda a desarrollar un foco epiléptico son: la capacidad de disparo a frecuencias altas con la generación de descargas intrínsecas; algún factor genético, disminución de la actividad de neuronas inhibitoras o un incremento en la transmisión excitadora. Dicha hiperexcitabilidad puede asociarse con diversas manifestaciones motoras, con o sin pérdida del



conocimiento y con o sin convulsiones.

Desde hace mucho tiempo la epilepsia se relacionó con aspectos sobrenaturales, por lo que durante varios siglos se trató sólo con métodos empíricos y fue hasta mediados del siglo pasado cuando Jackson hizo el primer intento por establecer las bases neuropatológicas de este padecimiento. En 1914, Cybulsky registró por primera vez los cambios electroencefalográficos en un modelo de epilepsia experimental. A partir de entonces y hasta nuestros días se han intensificado los estudios para tratar de dilucidar las causas y los mecanismos de generación de las crisis epilépticas, lo que ha permitido contar con un conocimiento más amplio para abordar la epilepsia de una manera cada vez más eficiente.

Se sabe que la epilepsia puede deberse a una gran variedad de factores, resultado de diferentes condiciones "patológicas" como traumatismos, lesiones vasculares, neoplasias, infecciones, privación de oxígeno y alteraciones metabólicas, endócrinas o por sustancias tóxicas. También se ha descubierto que algunos estímulos sensoriales como el ruido, las luces intermitentes y hasta el estrés pueden inducir convulsiones. Además, se han determinado algunos factores que son capaces de generar este padecimiento. Se conoce el patrón de disparo neuronal en animales de experimentación y en personas epilépticas, además se tienen determinadas muchas de las estructuras cerebrales y moléculas endógenas cuya función se altera durante las crisis epilépticas; de esta manera se ha avanzado mucho en el tratamiento de los

pacientes epilépticos. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de investigación en diversos modelos *in vivo* e *in vitro*, los mecanismos bioquímicos y electrofisiológicos que llevan a la hiperexcitabilidad en un foco epileptogénico y a la epilepsia no se conocen completamente (Feria et al., 1986; Rubio-Donnadieu, 1990; Fisher y Covey, 1991).

A pesar de los adelantos logrados, un alto porcentaje de los pacientes con epilepsia son refractarios a los tratamientos médicos usados. Por ejemplo, 30% de los pacientes con epilepsia de lóbulo temporal presentan convulsiones a pesar de la terapia farmacológica administrada, y sólo 2 de cada 3 personas con epilepsia logran un alivio satisfactorio con los medicamentos antiepilépticos usados hoy en día (21 en total). Por lo tanto, se requiere de compuestos anticonvulsivos más eficientes que los existentes y una mayor investigación experimental de cómo las alteraciones se traducen, en última instancia, en una función neuronal anormal. En este sentido, se han reproducido las crisis epilépticas mediante modelos experimentales y se han diseñado compuestos convulsivos y anticonvulsivos, de tal manera que casi todo lo que se conoce acerca de los mecanismos de epilepsia y de la terapia de drogas anticonvulsivas proviene del estudio de modelos animales de epilepsia.

## **B. LA 4-AMINOPIRIDINA.**

### **1. Generalidades.**

Uno de los compuestos más interesantes usados como modelo

experimental de epilepsia es la 4-aminopiridina (4-AP), compuesto que se sintetizó por primera vez en 1963. Su estructura consiste en un anillo de piridina que tiene unido en su carbono 4 a un grupo amino. Es un compuesto polar, con un peso molecular de 94.13. Se ha demostrado que la 4-AP cruza rápidamente la barrera hematoencefálica, ya que al inyectarse por vía intravenosa en ratones su paso total a través de esta barrera se produce en los primeros 5 min y después de 10 min las estructuras cerebrales con mayor unión de 4-AP son la corteza, el tálamo, la capa de células piramidales del hipocampo y las células granulares del cerebelo (Berger et al., 1989). La 4-AP se degrada de una manera rápida y se elimina totalmente por vía renal en aproximadamente 30 horas (Uges et al., 1987). Sin embargo, a dosis elevadas, sus efectos pueden persistir por más tiempo ya que en humanos intoxicados accidentalmente con 4-AP se observaron alteraciones motoras hasta 7 días después de su ingestión (Spyker et al., 1980).

## 2. Efectos in vitro.

La 4-AP incrementa la liberación de acetilcolina (ACh) en uniones neuromusculares de rana (Lundh y Thesleff, 1977; Molgó et al., 1977), de rata (Lundh, 1978), de pollo (Marshall et al., 1989), en el órgano eléctrico del Torpedo (Parducz et al., 1987) y además en el ileo de cobayo (Vizi et al., 1977), de tal manera que es capaz de liberar miles de quanta del transmisor en comparación con los casi 300 que lo hacen en ausencia de la droga (Thesleff, 1980).

En el sistema nervioso central, la 4-AP aumenta la amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores e inhibidores en médula espinal de gatos (Jankowska et al., 1977) y de ranas (Galindo y Rudomín, 1978), así como en neuronas neocorticales de rata (Kita et al., 1985). En sinaptosomas de cerebro de ratón, aumenta la liberación espontánea de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glutamato y ACh (Tapia y Sitges, 1982; Tapia et al., 1985), de glutamato en sinaptosomas de corteza de cuervo (Tibbs et al., 1989), de dopamina en sinaptosomas de estriado (Arzate et al., 1985), y de ACh en rebanadas de estriado (Dolezal y Tucek, 1983) y de corteza de ratas (Foldes et al., 1988). La 4-AP también aumenta la liberación de noradrenalina en el bazo del gato (Kirperkar et al., 1977) y en la vena porta de la rata (Leander et al., 1977).

### 3. Efectos in vivo.

La 4-AP es un compuesto que produce convulsiones en diversas especies animales, tales como ratones (Pasantes-Morales y Arzate, 1981; Tapia, 1982), ranas (Galvan et al., 1982), ratas (Pasantes-Morales et al., 1987), perros, pollos, caballos e inclusive el hombre (Spyker et al., 1980). Se ha reportado que al menos 41 especies, entre aves y mamíferos, son susceptibles a los efectos tóxicos de esta droga (Schaffer et al., 1973).

También se ha demostrado que la aplicación intraestriatal, por microdiálisis, de 4-AP en ratas incrementa la liberación de ACh y de dopamina, además su aplicación i.p. también incrementa la liberación de ACh en el estriado (Damsma et al., 1988).

#### 4. Usos y aplicaciones clínicas.

El primer uso que se le dio a la 4-AP fue como repelente para aves, ya que provoca desorientación, vuelo errático y emisión de sonidos, causados por contracciones involuntarias del diafragma, y de esta manera las aves abandonan el área (Schafer et al., 1973)

En clínica se ha usado principalmente en el tratamiento de enfermedades que repercuten en fallas de la transmisión colinérgica. Inicialmente las aminociridinas se usaron en clínica como agentes anticurarinérgico en situaciones postoperatorias y luego como un antagonista de la parálisis muscular causada por la toxina botulínica, antibióticos y por iones de magnesio (Thesleff, 1980), por ketamina-diazepam (Acoston et al., 1980) y para antagonizar el bloqueo muscular inducido por pancuronium (Uges et al., 1982).

También ha sido usada con cierto éxito en pacientes con otras enfermedades que afectan la transmisión neuromuscular, tales como el síndrome del Eaton-Lambert (Lundh et al., 1977). Además se han logrado mejorías en personas con miastenia gravis y miastenia congénita (Lundh et al., 1979; Murray y Newsom-Davis, 1981), en pacientes con esclerosis múltiple (Bostock et al., 1981; Jones et al., 1983) y con corea de Huntington (Uges et al., 1982). En el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer algunas veces se han observado mejoras (Wesseling et al., 1984), sin embargo, otros resultados son contradictorios (Davidson et al., 1988).

Poco a que en todos los padecimientos mencionados los pacientes han mostrado recuperaciones. en muchos casos van acompañadas por graves efectos colaterales como alteraciones cardiovasculares (Foldes et al., 1988) y otros que van desde periodos de confusión, desorientación, ansiedad, inquietud e insomnio hasta convulsiones, lo que limita su aplicación clínica (Spjker et al., 1990; Damsma et al., 1988).

### C. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISION.

En la neurotransmisión mediada por mensajeros químicos se distinguen dos tipos de información, una inhibidora y otra excitadora.

#### 1. Transmisión GABAérgica.

El GABA es el neurotransmisor inhibidor más abundante del SNC tanto de vertebrados como de invertebrados. En 1950 Roberts y Awapara descubrieron por separado la presencia de GABA en el tejido cerebral y la primera evidencia de que actúa como un neurotransmisor inhibidor en el SNC de los mamíferos fue aportada en 1967 por Krnjevic y Schwartz.

El GABA tiene un papel importante en la innibición de crisis convulsivas y en la acción de drogas anticonvulsivantes, de tal manera que los agonistas GABAérgicos son potentes anticonvulsivantes, por ejemplo las benzodiazepinas (diazepam y clonazepam) potencian la unión del GABA al receptor  $GABA_A$  y por lo tanto son usadas clínicamente como anticonvulsivantes. Otros compuestos que incrementan la síntesis y la liberación o

inhiben la recaptura y la degradación del GABA potencian la inhibición mediada por este neurotransmisor y elevan el umbral a diversos tipos de convulsiones. Por ejemplo el valproato, un potente anticonvulsivante que se usa clínicamente, incrementa los niveles cerebrales de GABA al inhibir la GABA transaminasa, enzima que degrada a este neurotransmisor.

El receptor GABA<sub>A</sub> es un complejo macromolecular formado por el sitio de unión al GABA, el receptor a benzodiazepinas y el canal iónico selectivo a cloro que juega un papel esencial en la inhibición neuronal y en la acción de algunas drogas anticonvulsivas (Tapia, 1983; Fisher y Coyte, 1991).

## **2. Neurotransmisión excitadora.**

### **a. Generalidades.**

El glutamato y el aspartato son dos aminoácidos que se hallan presentes en grandes cantidades en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. De hecho el glutamato es el aminoácido más abundante y la gran mayoría de las sinapsis excitadoras en el SNC están mediadas principalmente por él. Sin embargo, la mayor parte del glutamato cerebral participa en el metabolismo intermediario de neuronas y glia y sólo una fracción de la poza total del aminoácido participa en la transmisión neuronal (ver López-Colomé, 1983; Watkins, 1989). A pesar de ello, el glutamato cumple con los criterios propuestos por Werman en 1966 para la identificación de mediadores químicos como neurotransmisores en el sistema nervioso: posee sistemas de recaptura de alta afinidad; el aminoácido y la enzima que lo

sintetiza están presentes en la terminal nerviosa; posee una acción específica y ésta puede ser bloqueada por antagonistas; el glutamato está probablemente almacenado en vesículas sinápticas y es liberado de la terminal presináptica en una manera dependiente de  $Ca^{2+}$  hacia el espacio sináptico donde su concentración puede alcanzar niveles milimolares; interactúa con un receptor específico y ejerce un poderoso efecto despolarizante. Por lo anterior, el glutamato es considerado como el más potente aminoácido excitador (AAE) en el SNC de los vertebrados.

La investigación sobre AAE se inició en 1954 con los trabajos de Hayashi, aunque por esos años ya se resaltaba que la concentración de glutamato en el cerebro era mucho más elevada que en los demás tejidos. La idea inicial de que el glutamato podría actuar como neurotransmisor surgió en 1960 con el desarrollo de la técnica de iontoforesis, cuando Curtis y Watkins observaron que el glutamato ejercía un poderoso efecto excitador sobre la mayor parte de las neuronas del SNC. Estos estudios llevaron a suponer que el glutamato y el aspartato podrían ser los neurotransmisores excitadores primarios en este sistema (ver López-Colomé, 1983; Watkins, 1989).

#### **b. Receptores a aminoácidos excitadores.**

Los AAE ejercen sus funciones fisiológicas a través de distintos subtipos de receptores que han sido denominados en función de las moléculas agonistas que se unen específicamente a ellos y los activan. Primero se sugirió que existía un solo tipo



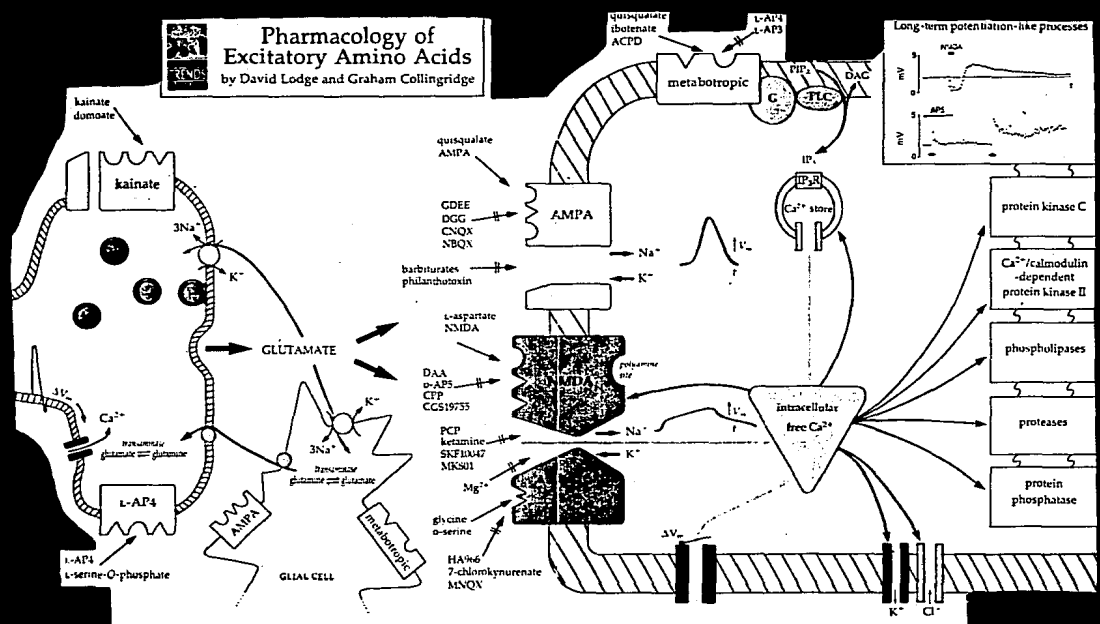
de receptor, luego se pensó en al menos 2 clases y luego en 3 o 4 tipos diferentes. Actualmente, desde un punto de vista farmacológico y de manera general, se puede decir que los receptores a AAE se clasifican en dos tipos: aquellos que son sensibles a N-metil-D-aspartato (receptores tipo NMDA) y aquellos que no lo son (tipo no NMDA). Los estudios electrográficos, bioquímicos y farmacológicos indican que existen al menos 5 tipos diferentes de receptores a AAE: el sensible a N-metil-D-aspartato (NMDA), el que responde al ácido kainico (AK), el activado por el ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico (AMPA), el que se modula por el ácido L-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4) y el receptor sensible al ácido trans-1,3-dicarboxílico-1-aminociclopentano (ACPD) (Fig. 1). Los cuatro primeros tipos de receptores son ionotrópicos, esto es, contienen canales específicos para determinados cationes, mientras que el último posee un mecanismo metabotrópico que involucra segundos mensajeros (Watkins, 1989).

Fig. 1. Esquema que muestra los 5 tipos diferentes de receptores a AAE, su localización, estructura, selectividad iónica y farmacología (Tomado de Lodge y Collindridge, 1990).

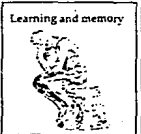
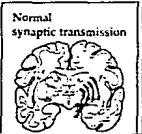


# Pharmacology of Excitatory Amino Acids

by David Lodge and Graham Collingridge



Physiological and pathological roles of EAAs



Epileptogenesis

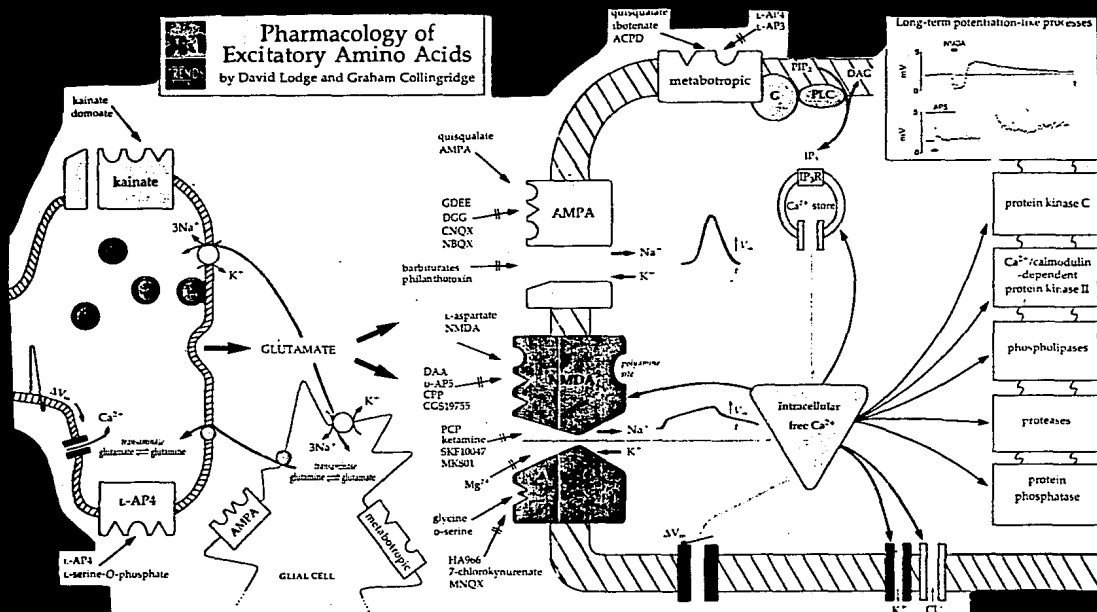
Acute neuropathology  
 hypoxia/ischaemia  
 stroke  
 trauma  
 hypoglycaemia  
 exogenous toxins

Chronic neuropathology  
 Alzheimer's disease  
 Huntington's chorea  
 Parkinson's disease  
 motor neuron disease

**TOCRIS NEURAMM**  
 Trends in Pharmacological Sciences  
 December 1990

# Pharmacology of Excitatory Amino Acids

by David Lodge and Graham Collingridge



Physiological and pathological roles of EAAs



Learning and memory



Developmental plasticity



Epileptogenesis

Acute neuropathology  
hypoxia/ischaemia  
stroke  
trauma  
hypoglycaemia  
exogenous toxins

Chronic neuropathology  
Alzheimer's disease  
Huntington's chorea  
Parkinson's disease  
motor neuron disease

**TOCRS NEURAMIN**

Trends in Pharmacological Sciences  
December 1990

### c. Los receptores tipo no-NMDA.

Dentro de la categoría de receptores a AÑE tipo no-NMDA se incluyen cuatro tipos diferentes: el receptor activado por AK, el modulado por el L-AP4, el receptor sensible al ACPD y el que se activa por la unión de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico (AMPA) y que anteriormente se conocía como receptor sensible a ácido quisquálico.

De los receptores tipo no-NMDA el de mayor importancia quizás sea el receptor sensible a AK, ya que también posiblemente este involucrado en procesos neuropatológicos.

El AK, aislado en 1976 del alga Dicentra simplex, es una potente neurotoxina. El AK induce prolongadas despolarizaciones, muerte neuronal y actividad neuronal epileptiforme y su administración i.p. en animales adultos resulta en la aparición de crisis convulsivas y en la degeneración selectiva de la población neuronal localizada en el estrato lúcido de la región CA3 del hipocampo. Sin embargo, prácticamente todas las regiones cerebrales tienen sitios de unión para este compuesto, aunque la mayor parte de ellos se encuentra en estructuras telencefálicas (hipocampo, corteza, amígdala, estriado, caudado, etc) y en el cerebelo. Las lesiones cerebrales que induce el AK son similares a las que se encuentran en pacientes con epilepsia y con enfermedad de Alzheimer. Es importante hacer notar que no existe una correlación entre la cantidad de sitios de unión para el AK y el grado de neurodegeneración que induce. Por ejemplo, el núcleo caudado tiene una alta concentración de sitios de unión

para AK pero no es especialmente sensible a su acción tóxica, ya que la administración sistémica o directa en el caudado produce mayor muerte neuronal en la corteza piriforme que en el caudado mismo (Monaghan y Cotman, 1982).

El mecanismo propuesto para explicar la acción neurotóxica del AK es por un influjo de sodio a través del canal iónico asociado al receptor, al cual sigue un influjo pasivo de cloro y la entrada de agua al interior celular, lo que resulta en un hinchamiento de la neurona hasta que la célula explota por choque osmótico (Choi, 1988; Monaghan et al., 1989).

Desafortunadamente, aun no se conocen antagonistas específicos para cada uno de los receptores tipo no-NMDA. Sin embargo, existen compuestos que se unen sin distinción a los receptores AK y AMPA, como son el ácido 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNOX), el ácido 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX) y el ácido quinurénico.

#### **d. El receptor tipo NMDA.**

De todos los receptores a AAE, la información y conocimiento que se tiene del receptor NMDA es la más completa. Esencialmente todas las regiones del cerebro muestran sitios de unión para el NMDA y la excepción más notable es el estrato lúcido del hipocampo (que como se mencionó anteriormente es la zona cerebral con mayor unión para el AK) (Monaghan y Cotman, 1985).

Recientemente se ha caracterizado la estructura molecular del receptor NMDA de la rata y ahora se sabe que consta de 4 segmentos transmembranales y un gran dominio extracelular

(Moriyoshi et al., 1991). Por otra parte, de los estudios farmacológicos y electrofisiológicos se sabe que es un complejo macromolecular y que tiene asociado un canal iónico selectivo para calcio, sodio y potasio (Fig. 2) y que posee al menos 5 sitios de modulación que se mencionan a continuación:

- **Sitio de unión al magnesio.** Se halla dentro del canal iónico asociado al receptor, y en consecuencia su unión es dependiente de voltaje. Este catión es un potente bloqueador de las corrientes iónicas que pasan a través del canal y por lo tanto reduce las despolarizaciones producidas por el receptor (Lodge et al., 1989). El magnesio es muy higroscópico y por lo tanto se une fuertemente a moléculas de agua, es por ello que se ha propuesto que como se necesita mucha energía para despojar el agua del magnesio este tiende a retenerla y de esta manera obstaculiza el canal iónico (Barnes, 1985). Lo anterior se apoya en el hecho de que el bloqueo del canal es voltaje-dependiente, ya que a un potencial de membrana cercano al potencial de reposo (-60 a -70 mV) el bloqueo por magnesio es muy fuerte y con despolarizaciones progresivas se produce un desbloqueo gradual ya que el magnesio se despega de su sitio y así las corrientes iónicas fluyen a través del canal. De aquí que una condición necesaria para que el receptor se active es que la membrana se despolarice para que el  $Mg^{2+}$  salga de su lugar y permita que los iones fluyan a través del canal (Mayer et al., 1984).

- **Sitio de unión a los anestésicos disociativos.** También se

halla en el interior del canal iónico pero se unen al canal sólo en estado abierto. El bloqueo por ácido 3-((RS)-2-carboxypiperazina-1-il)-propil-1-fosfónico (CPP) es dependiente del estado del receptor, de modo que es necesario que se halla primero el agonista y que active al receptor para que el bloqueo se pueda producir. Además del CPP, diversos compuestos son capaces de unirse a este sitio, entre ellos el MK-801 y el PCP (Monaghan et al., 1989). Aunque este sitio no es el mismo que el de unión al magnesio, los dos ligandos no pueden ocupar el canal al mismo tiempo (Bennet et al., 1991).

- Sitio de unión al transmisor endógeno, al que también se une el NMDA que es 100 veces más potente que el glutamato. Se halla ubicado en la parte extracelular. Diversos compuestos también son capaces de unirse a este sitio y antagonizar el efecto del transmisor (por ejemplo, derivados fosfonados, CPP, etc).

- Sitio de unión a la glicina, ubicado en la parte extracelular, en condiciones fisiológicas siempre se halla saturado por el aminoácido y esta condición es una de las necesarias para que el receptor pueda activarse. La glicina ejerce un efecto regulador alosterico positivo de la respuesta excitadora del receptor ya que incrementa las corrientes iónicas a través de su canal (Johnson y Ascher, 1987).

- Sitio de unión al zinc, que también esta ubicado en la parte extracelular del receptor. El zinc antagoniza la respuesta

del receptor NMDA por lo que se le ha implicado como un regulador de la actividad sináptica mediada por este receptor (Westbrook y Mayer, 1987). Algunos estudios sugieren que antidepresivos como la desmetilimipramina son capaces también de unirse a este sitio (Longe et al., 1989)

- **Sitio de unión a las poliaminas.** Recientemente se ha demostrado que las poliaminas espermina y espermidina son capaces de unirse a un sitio particular en el receptor NMDA. Esta unión ejerce un efecto regulador importante ya que es capaz de modular la unión del MK-801 (Williams et al., 1989) y quizás el efecto que tiene de incrementar las corrientes a través del canal se debe en parte a que aumenta la afinidad del receptor por la glicina (Ransom y Deschenes, 1990). Aún no es muy claro si este sitio se halla en la parte intra o extracelular del receptor.

Puesto que los antagonistas de este receptor se pueden unir al sitio de reconocimiento del transmisor endógeno o a cualquiera de los otros sitios, estos compuestos se han clasificado en competitivos y no competitivos, de acuerdo a si presentan competencia por la unión a determinado sitio del receptor. Si dicha competencia es a nivel del sitio de reconocimiento del transmisor endógeno, y por lo tanto del NMDA, se dice que el antagonista es competitivo, pero si el fármaco antagonista no compete con el NMDA sino que actúa a nivel de los otros sitios de modulación, a nivel del ionóforo o de los otros sitios acoplados, entonces este compuesto se denomina



antagonista no competitivo (Monaghan et al., 1985; Reynolds y Miller, 1988) (Fig. 2).

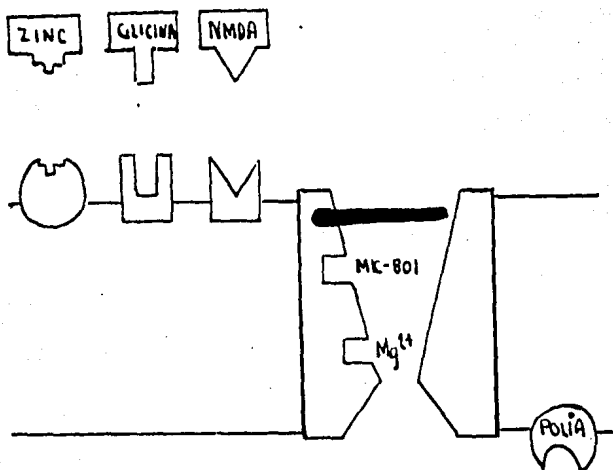


Fig. 2. Estructura molecular propuesta para el receptor tipo NMDA (Modificado de Reynolds y Miller, 1988).

#### e. El receptor NMDA y la epilepsia.

El receptor tipo NMDA ha adquirido una importancia primordial debido a la evidencia que lo involucra en una amplia variedad de procesos fisiológicos, como la transmisión sináptica

normal (Headley y Grillner, 1990), el crecimiento y la diferenciación neuronal (Monaghan et al., 1989; McDonald y Johnston, 1990), la regulación de la circuitería neuronal y la citoarquitectura (McDonald y Johnston, 1990), la plasticidad sináptica (Collingridge y Singer, 1990) y el aprendizaje y la memoria (Morris et al., 1986). Sin embargo, el receptor tipo NMDA también está involucrado de manera importante en diversos procesos patológicos como es la epilepsia (Dingledine et al., 1990), el daño neuronal inducido por hipoglucemia (Wieloch, 1985), isquemia (Simon et al., 1984) hipoxia, accidente cerebrovascular (embolia) y por diversas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la corea de Huntington, el mal de Parkinson y la demencia pugilística (Choi, 1988; Olney, 1990; Meldrum y Garthwaite, 1990), e inclusive enfermedades que provocan neurodegeneración como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Giulian et al., 1990) y el sarampión (Anderson et al., 1991).

En relación con la epilepsia, diversos autores han sugerido que los receptores tipo NMDA participan de manera importante en los mecanismos fisiopatológicos de la epilepsia. En muchos trabajos se ha demostrado que los antagonistas de este receptor son capaces de disminuir o prevenir la hiperexcitabilidad neuronal provocada en diversos modelos experimentales de epilepsia. Entre éstos se incluyen modelos in vivo, como cepas genéticamente susceptibles, la administración de compuestos químicos en animales de laboratorio o su exposición a diversas

condiciones físicas. El mismo efecto se ha observado en modelos in vitro, que consisten en generar actividad eléctrica epileptiforme en rebanadas de estructuras cerebrales tales como hipocampo y corteza. De esta manera, se ha logrado dilucidar la importancia de los receptores NMDA en la génesis y el desarrollo de crisis epilépticas (Singledine et al., 1990).

La primera demostración de la acción anticonvulsiva de los antagonistas del receptor NMDA fue realizada por Croucher et al. quienes demostraron que el AP-5, el AP-6 y el AP-7 poseían un poderoso efecto protector contra las convulsiones inducidas por la administración de pentilentetrazol en roedores y contra las convulsiones audiogénicas provocadas en la cepa de ratones DBA/2 (Croucher et al., 1982). A partir de esos trabajos se ha demostrado un efecto similar en epilepsia experimental inducida por electrochoque (McNamara et al., 1988; Kulkarni y Ticku, 1989), 1-iminociclopropanocarboxilatos (Skolnick et al., 1989), ácido 3-mercaptopropiónico, tiosemicarbazida, metil-6,7-dimetoxi-4-etil- $\beta$ -carbolina-3-carboxilato (Czuczwar y Meldrum, 1982), cocaína (Wilkins y Tortella, 1991), bicuculina, carbacol y ácido kaínico aplicados en el "área tempestas" (Piredda y Gale, 1986; Gale et al., 1988), pilocarpina (Millan et al., 1986), pentilentetrazol (Velisek et al., 1990), NMDA y ácido quinolínico (Turski et al., 1987; Vezzani et al., 1988), penicilina (Loeb et al., 1990), kindling amigdalino (Morimoto, 1989), convulsiones en el ratón audiosensible de la cepa DBA/2 (Jones et al., 1984) y convulsiones en el mono fotosensible

Papio papio (Meldrum et al., 1983). Un efecto similar se ha encontrado al reducir actividad epileptiforme *in vitro* en rebanadas de estructuras cerebrales (Dingledine et al., 1986; Avoli et al., 1987; Asthon et al., 1988; Gean et al., 1988; Stasheff et al., 1989). A nivel de epilepsia clínica solo se ha informado la valoración de un antagonista, el MK-801 en 20 pacientes a los que se les administro 0.6 mg por día de este compuesto (además de la terapia anticonvulsiva convencional), en el que no se reportaron efectos colaterales y 8 de los pacientes comentaron tener al menos un 50% de disminución en el número de convulsiones (ver Fisher y Coyle, 1991).

#### D. LAS DIHIDROPIRIDINAS

Desde su introducción en Japón y Europa en la década de los 70, los antagonistas de  $Ca^{2+}$  han sido ampliamente usados en el tratamiento de la hipertensión arterial. Las dihidropiridinas (DHP) (nifedipina, nisoldipina, nitrendipina y nimodipina) son los antagonistas más específicos y potentes que actúan sobre los canales de  $Ca^{2+}$  de tipo L. La nifedipina parece ser el vasodilatador arterial más potente de todos los antagonistas de  $Ca^{2+}$  y por ello se ha usado en la clínica para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como la angina de pecho y la hipertensión (Schramm et al., 1983).

A partir de las muchas evidencias que sugieren la participación del  $Ca^{2+}$  como un catión importante en la generación de las crisis convulsivas, el grupo de Meyer fue el primero en evaluar y concluir el papel anticonvulsivo de las

DHP contra las convulsiones inducidas por pentilentetrazol (Meyer et al., 1986a). A partir de esos y otros resultados se ha demostrado que dichos compuestos poseen un potente efecto anticonvulsivo en diversos modelos experimentales de epilepsia tales como convulsiones provocadas por compuestos químicos como pentilentetrazol (Meyer et al., 1986a; Meyer et al., 1987; O'Neill y Bolger, 1990), BAY K 8644 (Shelton et al., 1987), cefazolina (Norocutti et al., 1986) y bicuculina (Meyer et al., 1986a). Además, protegen a los animales de convulsiones provocadas por manipulaciones como la exposición del animal a altas presiones atmosféricas (Dolin et al., 1988); kindling hipocámpico (Vezzani et al., 1988), isquemia (Meyer et al., 1986a) y por estimulación eléctrica (Meyer et al., 1986b). Inclusive se ha observado una ligera mejoría de pacientes humanos con epilepsia refractaria al tratarlos con nifedipina, aunque estos datos no son claros (Sander y Trevisol-Bittencourt, 1990).

Pese a los efectos anticonvulsivos de las DHP, en un estudio previo nosotros encontramos que la nifedipina no protege sino que potencia la actividad convulsiva inducida por la administración i.p. e i.n. de 4-AP en ratas (Fracoso-Veloz et al., 1990). Este efecto sinergista se reflejó en un incremento significativo en el número de SFM provocadas por la administración i.h. de 4-AP (Fig. 3)

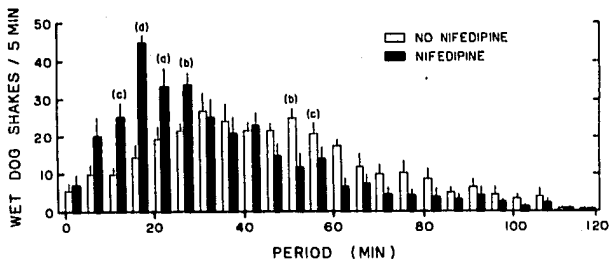


Fig. 1. Effect of nifedipine (20 mg/kg s.c.) on the occurrence of WDS induced by the administration of 4-AP (2.1 nmol) into the CA1 hippocampal region. Nifedipine was injected 30 min before 4-AP. Values are mean numbers of WDS/5 min  $\pm$  S.E. for nine (no nifedipine) and eight (nifedipine) rats. <sup>a</sup> P < 0.05, <sup>b</sup> P < 0.02, <sup>c</sup> P < 0.01, <sup>d</sup> P < 0.001, as compared with the corresponding rats not treated with nifedipine.

Figura 3. Efecto de la nifedipina (20 mg/kg) en la frecuencia de SFM inducida por la administración de 4-AP (2.1 nmol) en la región CA1 hipocámpica. (Tomado de Fragoso-Veloz et al., 1990)

Además, diversos parámetros utilizados para cuantificar la actividad convulsiva inducida por la administración i.p. de la 4-AP también se incrementaron significativamente al pretratar las ratas con las DHP (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de las dihidropiridinas sobre la actividad convulsiva inducida por la administración i.p. de 4-AP (5 mg/kg) (Tomado de Fragoso-Veloz et al., 1990).

TABLE 1

Effect of dihydropyridines on seizures induced by the i.p. injection of 4-AP (5 mg/kg).

Treatment	Dihydropyridine dose (mg/kg) <sup>a</sup>	Total number of generalized tonic convulsions (GTC)/ number of rats treated	% of rats showing GTC	% of rats dying during GTC <sup>b</sup>
4-AP	-	103/119 = 0.8 <sup>c</sup>	73.9	12.6
4-AP + nifedipine	0.1	11/15 = 0.7	66.1	20.0
4-AP + nifedipine	0.25	26/30 = 0.8	70	16.0
4-AP + nifedipine	5	8/7 = 1.1	100	28.5
4-AP + nifedipine	7.5	16/8 = 2	100	75.0 <sup>d</sup>
4-AP + nifedipine	10	22/16 = 1.3	100	56.2 <sup>d</sup>
4-AP + nifedipine	20	14/8 = 1.7	100	87.5 <sup>d</sup>
4-AP + nifedipine	50	7/4 = 1.7	100	75.0 <sup>d</sup>
4-AP + nisoldipine	20	10/6 = 1.6	83.3	83.3 <sup>d</sup>
4-AP + nitrendipine	20	8/5 = 1.6	80	60.0 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> The dihydropyridines were administered s.c., except the two lower doses, which were injected i.p., 30 min before the administration of 4-AP. <sup>b</sup> The time to death was equally variable in the dihydropyridine-treated and the control animals (20-78 min after 4-AP injection). <sup>c</sup> First GTC occurred at 32.8  $\pm$  1.6 min after 4-AP injection. <sup>d</sup> P < 0.005, as compared to 4-AP alone (chi-square test).

### III. O B J E T I V O

De los antecedentes revisados se concluye que el mecanismo de acción por el cual la 4-AP provoca sus efectos convulsivos no es claro. En los antecedentes se mencionó que esta droga incrementa la liberación espontánea de glutamato en sinaptosomas y además en el animal in vivo es capaz de aumentar los potenciales postsinápticos excitadores. De aquí que es posible postular que los aminoácidos excitadores participan de manera importante en la generación de las crisis convulsivas inducidas por la administración i.p. e i.h. de la 4-AP. Asimismo, tomando en cuenta la gran variedad de modelos experimentales de epilepsia en que los antagonistas de receptores NMDA ejercen un efecto protector, se puede postular que estos compuestos tendrán un efecto antagonista de los efectos de la 4-AP. Este es el objetivo primordial del presente trabajo. Por otra parte, para tratar de discernir alguna especificidad de los receptores glutamatérgicos involucrados en tal mecanismo, también se utilizaron antagonistas selectivos para los receptores tipo no NMDA.



#### IV. MATERIALES Y METODOS

Los animales experimentales, el procedimiento empleado, así como las drogas usadas y las vías de administración están descritas de manera completa en la sección correspondiente del trabajo que se ha enviado para su publicación, y que constituye la siguiente parte del presente trabajo de tesis. Asimismo, los resultados experimentales se describen en dicho artículo.

V. ARTICULO ENVIADO  
PARA PUBLICACION

**NMDA ANTAGONISTS PROTECT AGAINST SEIZURES AND  
WET-DOG SHAKES INDUCED BY THE SYSTEMIC OR  
INTRAHIPPOCAMPAL ADMINISTRATION OF 4-AMINOPYRIDINE**

**Jorge Fragoso-Veloz and Ricardo Tapia\***

**Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional  
Autónoma de México, México D.F., México**

**\* To whom all correspondence should be addressed: Departamento de Neurociencias,  
Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado  
Postal 70-600, 04510- México, D.F., México**

**Tel. (525) 550-5215 ext. 4935.**

**Fax (525) 548-0387**

## Abstract

The effect of N-acetyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists on the generalized tonic-clonic convulsions (GTC) and wet-dog shakes induced by the intraperitoneal (i.p.) or the intrahippocampal (i.h., CA1 region) administration of 4-aminopyridine (4-AP) was studied in rats. Pretreatment with NMDA competitive and non-competitive antagonists resulted in a notable protection against the motor effects of both the i.p. and the i.h. administration of 4-AP. MK-801 (0.25 mg/kg, i.p.) and 3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP, 0.3 nmol intracerebroventricular, i.c.v.) showed the most powerful anticonvulsive effect, since they prevented the occurrence of GTC and the death of the animals in convulsions after i.p. 4-AP. The i.c.v. injection (10 nmol) of the NMDA competitive antagonists 2-amino-5-phosphonopentanoate (AP-5) and 2-amino-5-phosphonoheptanoate (AP-7) showed also a clear although less potent protective effect. Similarly, the frequency of wet-dog shakes induced by i.h. 4-AP was remarkably decreased by pretreating the animals with i.p. MK-801 or with i.c.v. CPP or AP-7. However, the co-injection of CPP with 4-AP failed to protect against the occurrence of wet-dog shakes. The i.c.v. pretreatment with the unselective antagonist kynureate (up to 68 nmol) or with the non-NMDA receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (0.5 nmol) did not significantly modify the effects of 4-AP when administered either i.p. or i.h. We conclude that NMDA receptors are involved in the mechanism of

the convulsive activity induced by 4-AF, probably because this drug induces the release of glutamate.

Key words:

4-Aminopyridine; NMDA receptors; Convulsions; Wet-dog shakes

## 1. Introduction

The epileptogenic action of 4-aminopyridine (4-AP), both *in vivo* (Schnafer et al., 1973; Spyker et al., 1980) and *in vitro* (Voskuyl and Aibus, 1985; Avoli, 1990; Gean et al., 1990), is well known. Recently, we have shown that the stereotaxic microinjection of 4-AP into the CA1 region of the hippocampus (i.e. administration) of rats induces limbic-type seizures and wet-dog shakes (WDS) whereas its i.p. administration induces generalized tonic convulsions (GTC) and a series of preconvulsive symptoms, including myoclonus, hyperexcitability, tremors, head nodding, forepaw tremor, salivation, sniffing, rearing, chewing and grooming (Fragoso-Veloz et al., 1990).

The excitatory amino acids (EAA), L-glutamate and L-aspartate, exert their functions via distinct receptor subtypes that have been characterized in terms of the preferred agonists. Among the several EAA receptor types known, the activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype seems to be involved in the genesis and development of epileptiform activity (Dingledine et al., 1990). Accordingly, a clear anticonvulsant action of both competitive and non-competitive NMDA antagonists has been described in several seizure models (Croucher et al., 1982; Asthon et al., 1988; Löscher et al., 1988; Tricklebank et al., 1989; Dingledine et al., 1990).

It has been found that 4-AP induces the release of neurotransmitters, including glutamate, in a calcium-dependent manner (Tapia and Sitges, 1982; Tibbs et al., 1989), but it is

not clear whether such effect is related to its convulsant action. The purpose of the present work was to study the possible role of EAA and their receptors in the convulsant activity induced by the i.p. and the i.h. administration of 4-AP. To this aim, we tested the effect of several NMDA and non-NMDA receptor antagonists on 4-AP action.

## 2. Materials and methods

Adult male Wistar rats ( $195 \pm 5$  g weight) were used in all experiments. 4-AP was administered i.p. (5 mg/kg) or i.h. (2.1 nmol) (Fragoso-Veloz et al., 1990) to rats injected i.p. or i.c.v. 20-30 min before with the doses of NMDA or non-NMDA antagonists indicated under Results. When the antagonists were injected i.c.v. prior to the i.h. administration of 4-AP, both microinjections were made during the same period of anesthesia. Other rats were injected i.h. with 4-AP (2.1 nmol) together with certain antagonists. In all cases control rats, injected i.p. or i.h. with saline, were included in parallel with the experimental groups receiving the receptor antagonists.

### 2.1 Intrahippocampal and intracerebroventricular microinjections

For the i.h. and i.c.v. administration of the drugs, rats were anesthetized with halothane in oxygen, immobilized in a Kopf stereotaxic instrument and injected unilaterally during anesthesia into the CA1 region of the hippocampus or the lateral ventricle. The injection volume for the i.h. injection was 0.1  $\mu$ l, and for the i.c.v. injection 5  $\mu$ l, using a 0.5 or a 10  $\mu$ l



Hamilton syringe, mounted on a manual Kopf injector. The duration of the injection was 2-3 min for the hippocampus and 6-8 min for the ventricle. Stereotaxic coordinates used, derived from Paxinos and Watson (1986) and using bregma as reference point, were: P 3.2, L 2.0 and V 3.0 for the hippocampus and P 0.8, L 1.7 and V 3.9 for the lateral ventricle. All solutions contained Direct blue 15 (1 mg/ml) in order to locate the site of injection. This dye per se did not produce any effect. The rats were observed until full recovery (2-3 h) or until they died in convulsion.

## 2.2. Drugs

4-Aminopyridine and Direct blue 15 were from Sigma Chemical Co. ( $\pm$ )-3-(2-Carboxypiperazin,-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP), (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (MK-801), ( $\pm$ )-2-amino-3-phosphonopropionic acid (AP-3), ( $\pm$ )-2-amino-4-phosphonobutyric acid (AP-4), ( $\pm$ )-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5) and ( $\pm$ )-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid (AP-7) were from Research Biochemicals Inc. Kynurenic acid and 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNOX) were from Tocris Neuramin. Ketamine was purchased as Imalgen (Rhone Merieux).

4-AP was dissolved in saline. CPP, AP-3, AP-4, AP-5, AP-7, MK-801 and kynurenic acid were dissolved in saline and the pH was adjusted to 7.4. CNOX was dissolved in NaOH, the final volume made up with saline and the pH was adjusted to 7.4 with HCl. The solution of ketamine was prepared by appropriate dilution in saline of the content of Imalgen solution.

## 2.3. Histology

At the end of the experiments, the animals were killed by decapitation, the brain was dissected out and 80  $\mu$ m thick coronal sections were obtained in a cryostat for histological verification of the site of injection (hippocampus and lateral ventricle). All rats with misplaced injections were discarded.

## 3. Results

### 3.1. Systemic 4-AP

As previously reported (Fragoso-Veloz et al., 1990), the i.p. administration of 4-AP (5 mg/kg) induced GTC in 70-78 % of the rats (tables 1 and 2). Most animals showed only one GTC, although in some of them it occurred twice. All the animals that did not die recovered 2-3 h after drug administration.

The NMDA antagonists completely prevented or importantly decreased all the convulsive parameters evaluated. The competitive antagonists were injected i.c.v., since they do not readily cross the blood-brain barrier. Among them, CPP at a dose of 0.8 nmol exerted the most powerful protective effect against i.p. 4-AP, since it produced a complete protection against convulsions and lethality. The EAA phosphonic acid derivatives of longer carbon chain, AP-5 and AP-7, also showed a clear protective effect, decreasing by 65% the number of GTC and by 57% the number of animals convulsing, whereas AP-3 and AP-4 had a weaker anticonvulsant action (table 1).

In contrast to the notable effect of the NMDA antagonists, the i.c.v. administration of relatively high doses of the broad-

spectrum EAAs antagonist bicuculline or the non-NMDA antagonist CNQX failed to protect the animals against the convulsive action of systemic 4-AP (table 1).

Because of its higher penetration through the blood-brain barrier, the non-competitive NMDA antagonists were administered i.p. As shown in table 2, MK-801 at a dose of 0.1 mg/kg had a slight protective action against i.p. 4-AP and at a higher dose (0.25 mg/kg) completely prevented the occurrence of both GTC and death. These rats, however, showed hyperexcitability and mild ataxia. Ketamine had no protective effect at doses of 5-10 mg/kg, whereas at 20 mg/kg it prevented death and decreased by about 50% both the number of GTC and the number of animals convulsing (table 2). However, the rats injected with this dose showed mild ataxia.

All the NMDA competitive and non-competitive antagonists used blocked only the occurrence of GTC and death, but the preconvulsive symptoms mentioned in the Introduction were not affected. When the protection was not complete the latency to convulsions ( $39.8 \pm 4.3$  min, n = 35) and to death ( $54.2 \pm 7.7$  min, n = 9) induced by i.p. 4-AP was not significantly altered by the antagonists.

### 3.2. Intrahippocampal 4-AP

As previously reported (Fragoso-Veloz et al., 1990), the microinjection of 4-AP (2.1 nmol) into the CA1 hippocampal region induced the appearance of WDS immediately after the rats recovered from anesthesia. The frequency of WDS increased

progressively. reached a plateau value of 20-25 WDS/5 min at 25-30 min and decreased slowly thereafter until they completely disappeared at about 2 h (figs. 1-4).

As in the case of the systemic administration of 4-AP, the prior i.c.v. administration of CPP (0.8 nmol) exerted a remarkable protective action against the behavioral effects of i.h. 4-AP, since the frequency of WDS was notably reduced at all times, particularly at the peak (25-35 min), when a nearly complete blockade of the shaking behavior was observed (fig. 1A). The i.c.v. injection of AP-7 (10 nmol) also resulted in a notable protection, only slightly less powerful than that of CPP (fig. 1B), whereas the short chain derivative AP-3 at the same dose exerted a clear but considerably weaker protective effect (fig. 1C). The i.c.v. administration of the non-NMDA antagonist CNQX (0.5 nmol) failed to protect against the action of i.h. 4-AP, since the frequency curve of WDS was identical to that after the convulsant alone (fig. 2).

In view of the potent antagonist action of i.c.v. CPP, it was of interest to study whether the injection of this drug into the hippocampus, together with 4-AP, resulted in a similar protection. As shown in fig. 3, under this experimental conditions CPP was ineffective, in spite of the fact that the dose was higher than that injected i.c.v. Paradoxically, an increase in the occurrence of WDS was observed between 40 and 60 min, although this potentiation did not reach statistical significance.

In parallel with the results of the systemic injection of 4-AP, the prior i.p. administration of MK-801 (0.25 mg/kg) showed a potent protective effect against i.h. 4-AP. This antagonist action was similar to that of i.c.v. CFP, except that it was not immediate but manifested clearly at about 10 min after recovery from anesthesia (fig. 4).

Besides WDS, the i.h. injection of 4-AP produces some symptoms characteristic of limbic-type seizures, such as sniffing, masticatory movements, grooming, rearing and forepaw tremor (Fragoso-Veloz et al., 1990). These symptoms were also present, although less evident, when the NMDA antagonists were administered.

#### 4. Discussion

The NMDA receptor antagonists used in this work showed a notable protective effect against the behavioral motor alterations produced by both the i.p. and the i.h. administration of 4-AP. In agreement with their comparatively high potency as NMDA receptor antagonists, CFP and MK-801 showed the most remarkable protective action under the two experimental conditions used. Protection was also provided by phosphonic derivatives of the EAA, with relative potencies in accord with the length of their carbon chain, which correlates with their efficacy in blocking NMDA-evoked responses (Watkins and Olverman, 1987).

It is interesting that the dose of MK-801 which nearly prevented the motor effects of 4-AP was in the low range of its

effective anticonvulsant doses against the i.h. injection of quinolinic acid (Vezzani et al., 1989) and against electroshock, NMDA, pentylenetetrazole, bicuculline and audiogenic seizures (Clineschmidt et al., 1982; McNamara et al., 1988; Tricklebank et al., 1989), whereas higher doses are required for antagonizing the kindling-induced seizures (Gilbert, 1988; McNamara et al., 1988).

Our observations clearly indicate that the activation of NMDA receptors plays an important role in the mechanism of 4-AP-induced hyperexcitation, whereas non-NMDA receptors do not seem to be involved since CNQX and kynurenic acid were ineffective. It is therefore plausible that the administration of 4-AP, both i.p. and i.h., results in a stimulation of the release of glutamate from nerve terminals, as it has been shown *in vitro*, in synaptosomes (Tapia and Sitges, 1982; Tapia et al., 1995; Tibbs et al., 1989) and in striatal slices (Dolezal and Tucek, 1983), and that the excess released glutamate hyperactivates the NMDA receptors, with the consequent convulsive activity. In fact, it has been repeatedly shown that NMDA is a potent convulsant and that NMDA receptor antagonists are good anticonvulsants in a variety of experimental models of epilepsy (see Dingledine et al., 1990, for a review).

It is noteworthy that the NMDA antagonists tested were capable of preventing the generalized tonic phase of convulsion induced by i.p. 4-AP but their effect on the preconvulsive symptoms described under Results was weak. A similar partial

protective effect has been demonstrated with AP-7 against seizures induced by 3-mercaptopropionic acid, thiosemicarbazide and methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate (Czuczwar and Meldrum, 1982). This suggests that overfunction of NMDA receptors plays a relevant role in the generation of ETC but not in the development of the other symptoms.

The finding that AP-7 and CPP injected i.c.v. were very effective in preventing the WDS produced by i.h. 4-AP, whereas the i.h. injection of CPP at relatively high doses not only was ineffective, but even potentiated the effect of 4-AP after 40 min (fig. 3), suggests that the activation of NMDA receptors resulting in seizures or in WDS occurs at a site different from the CA1 area of the hippocampus. In agreement with this, we have previously shown that the epileptogenic action of i.h. 4-AP propagates to other brain regions, including the cortex, the amygdala and the dorsal raphe (Fragoso-Veloz et al., 1990). Furthermore, it has been reported that in hippocampal slices AP-5, AP-7 and CPP augment the epileptiform bursting elicited in CA1 or CA3 neurons by kainate or quisqualate (Collingridge et al., 1983; Neuman et al., 1988) or by electrical stimulation in the presence of picrotoxin (Dingledine et al., 1986).

In conclusion, the present study shows that NMDA receptors are involved in the motor hyperexcitability induced by both the i.p. and the i.h. administration of 4-AP. This strongly suggests that, although different neurotransmitters may participate in the final expression of the motor behavior, as it is the case for

serotonergic neurotransmission in WDS (Bedard and Pycock, 1977). The mechanisms responsible for the DTG and WDS induced by 4-AP have a common glutamatergic participation. The precise localization of the implicated NMDA receptor-containing cerebral regions requires further investigation.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación (DGAPA, UNAM, IN-201089) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (project P228CCDX-880370).



## References

- Asthon, D., R. Willems, E. De Prins and A. Wauquier, 1988, Selective inhibition of synaptic versus non-synaptic epileptogenesis by NMDA antagonists in the *in vitro* hippocampus, *Epilepsy Res.* 2, 219.
- Avoli, M., 1990, Epileptiform discharges and a synchronous GABAergic potential induced by 4-aminopyridine in the rat immature hippocampus, *Neurosci. Lett.* 117, 93.
- Bedard, P. and C.J. Pycock, 1977, "Wet-dog" shake behaviour in the rat: a possible quantitative model of central 5-hydroxytryptamine activity, *Neuropharmacology* 16, 663.
- Clineschmidt, B.V., G.E. Martin and P.R. Bunting, 1982, Anticonvulsant activity of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[*a,d*]cycloheptan-5,10-imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic, and apparent anxiolytic properties, *Drug Dev. Res.* 2, 123.
- Collingridge, G.L., S.J. Kehl and H. McLennan, 1983, The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones *in vitro*, *J. Physiol.* 334, 19.
- Croucher, M.J., J.F. Collins and B.S. Meldrum, 1982, Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists, *Science* 216, 899.
- Dzuczwar, S.J. and B. Meldrum, 1982, Protection against chemically induced seizures by 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid, *European J. Pharmacol.* 83, 335.

- Dingledine, R., M.A. Hynes and G.L. King, 1986. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in epileptiform bursting in the rat hippocampal slice, *J. Physiol.* 380, 175.
- Dingledine, R., C.J. McBain and J.O. McNamara, 1990. Excitatory amino acid receptors in epilepsy, *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 334.
- Dolezal, V. and S. Tucek, 1983. The effects of 4-aminopyridine and tetrodotoxin on the release of acetylcholine from rat striatal slices, *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 323, 90.
- Gilbert, M.E., 1988. The NMDA-receptor antagonist, MK-801, suppresses limbic kindling and kindled seizures, *Brain Res.* 463, 90.
- Fragoso-Veloz, J., L. Massieu, R. Alvarado and R. Tapia, 1990. Seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine, and their potentiation by nifedipine, *European J. Pharmacol.* 178, 275.
- Gean, P. W., C. Shui-Mei and C. Fang-Chia, 1990. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat amygdala neurons: the involvement of N-methyl-D-aspartate receptors, *European J. Pharmacol.* 184, 213.
- Löschner, W., B. Nolting and D. Hönack, 1988. Evaluation of CPP, a selective NMDA antagonist, in various rodent models of epilepsy. Comparison with other NMDA antagonists, and with diazepam and phenobarbital, *European J. Pharmacol.* 152, 9.
- McNamara, J.O., R.D. Russell, L. Rigsbee and D.W. Bonhaus, 1988. Anticonvulsant and antiepileptogenic actions of MK-801 in the

- kindling and electroshock models, *Neuropharmacology* 27, 563.
- Neuman, R., E. Cherubini and Y. Ben-Ari, 1988, Epileptiform bursts elicited in CA<sub>1</sub> hippocampal neurons by a variety of convulsants are not blocked by N-methyl-D-aspartate antagonists, *Brain Res.* 459, 265.
- Paxinos, G. and C. Watson, 1986, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, Sydney).
- Schafer, E. W., R. B. Brunton and D. J. Cunningham, 1973, A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridine to birds and mammals, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 26, 532.
- Spyker, D.A., C. Lynch, J. Shabanowitz and J.A. Sinn, 1950, Poisoning with 4-aminopyridine: Report of three cases, *Clin. Toxicol.* 16, 487.
- Tapia, R. and M. Sitges, 1982, Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes, *Brain Res.* 250, 291.
- Tapia, R., M. Sitges and E. Morales, 1985, Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes, *Brain Res.* 361, 373.
- Tibbs, G. R., A. P. Barrie, F.J.E. van Mierhem, H. T. McMahon and D. G. Nicholls, 1989, Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and glutamate release, *J. Neurochem.* 53, 1693.
- Tricklebank, M.D., L. Singh, R.J. Oles, C. Preston and S.D. Iversen, 1989, The behavioural effects of MK-801: a comparison with antagonists acting non-competitively and competitively at the NMDA receptor, *European J. Pharmacol.* 167, 127.

- Vezzani, A., R. Serzfini, M.A. Stasi, S. Caccia, I. Conti, R.V. Tridico and R. Samanin. 1989, Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249. 278.
- Voskuyl, R. A. and H. Albus. 1985, Spontaneous epileptiform discharges in hippocampal slices induced by 4-aminopyridine. *Brain Res.* 342. 54.
- Watkins, J. C. and H. J. Olverman. 1987, Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci.* 10. 265.

TABLE 1

Effect of the i.c.v. pretreatment with NMDA and non-NMDA antagonists on seizures induced by the i.p. injection of 4-AP (5 mg/kg).

Antagonist dose (nmol)	Total number of GTC*/number of rats treated	% of rats showing GTC	% of rats dead in GTC
No antagonist	20/23 = 0.86	78	8
<b>Competitive NMDA antagonists</b>			
AP-3 (10)	3/5 = 0.6	60	0
AP-4 (10)	9/7 = 1.1	62.5	14.2
AP-5 (10)	2/6 = 0.3	33.3	16
AP-7 (1)	2/6 = 0.3	33.3	16.6
(10)	3/9 = 0.3	33.3	0
CPP (0.4)	13/19 = 0.6	57.9	5.3
(0.8)	0/9 = 0	0	0
<b>Non-NMDA antagonists</b>			
KYN (34)	5/8 = 0.6	50	25
(68)	7/7 = 1	100	44.4
CNGX (0.5)	7/12 = 0.75	75	8

\* Generalized tonic convulsion

TABLE 2

Effect of the i.p. pretreatment with non-competitive NMDA antagonists on seizures induced by the i.p. injection of 4-AP (5 mg/kg).

Antagonist dose (mg/kg)	Total number of GTC*/number of rats treated	% of rats showing GTC	% of rats dead in GTC
No antagonist	23/25 = 0.98	70	27
MK-801 (0.1)	5/10 = 0.5	50	10
(0.25)	0/10 = 0	0	0
Ketamine (5)	6/5 = 1.2	100	20
(10)	4/6 = 0.6	66	16
(20)	2/5 = 0.4	40	0

\* Generalized tonic convulsion

## FIGURE LEGENDS

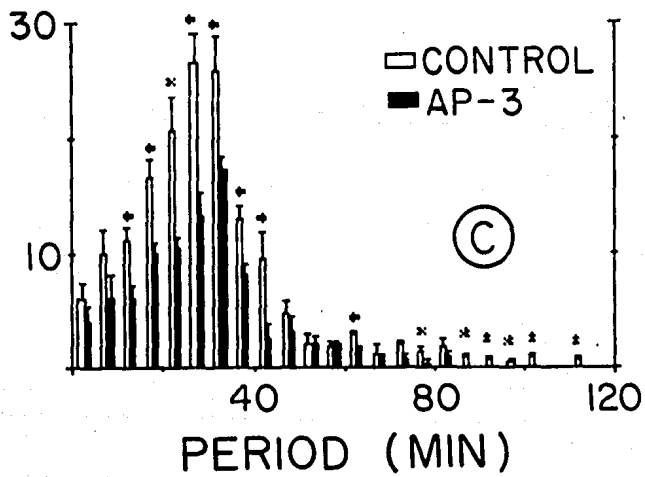
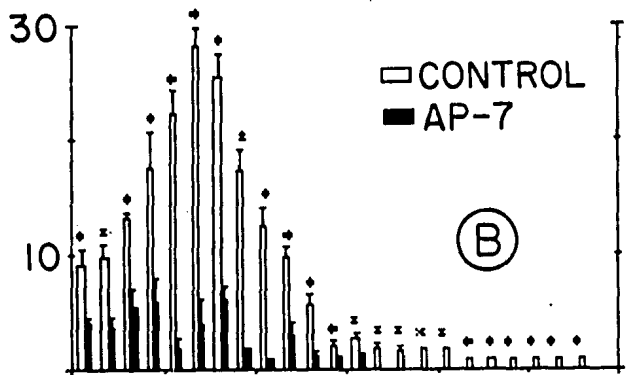
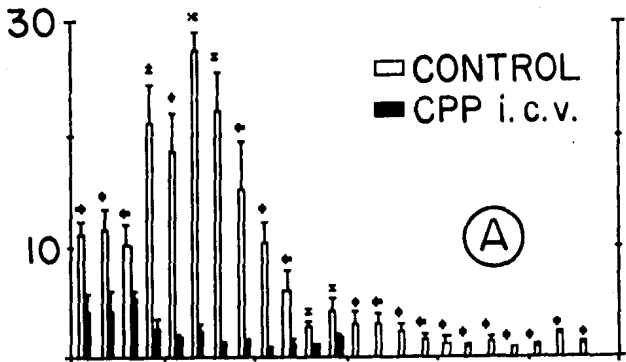
Fig. 1. Effect of the i.c.v. pretreatment with CPP (0.2 nmol, panel A), AP-7 (10 nmol, panel B) or AP-5 (10 nmol, panel C) on the occurrence of WDS induced by the i.h. microinjection of 4-AP (2.1 nmol). Values are mean number of WDS/5 min  $\pm$  S.E. for 5-10 (controls) and 7-9 (NMDA antagonists) rats. \*  $P < 0.05$ , as compared with the corresponding controls.

Fig. 2. Effect of the i.c.v. pretreatment with CNQX (0.5 nmol) on the occurrence of WDS induced by the i.h. microinjection of 4-AP (2.1 nmol). Values are mean number of WDS/5 min  $\pm$  S.E. for 7 (control) and 9 (CNQX) rats. \*  $P < 0.05$ , as compared with the corresponding controls.

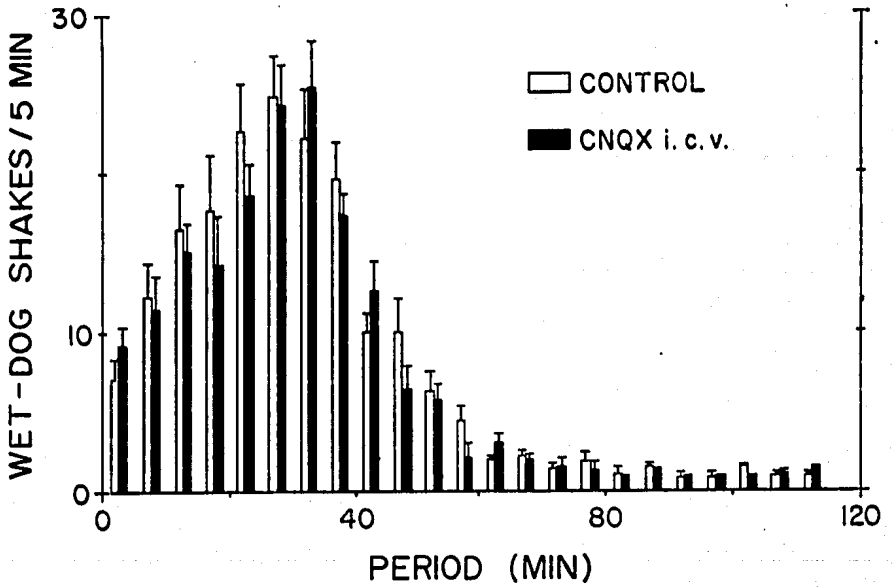
Fig. 3. Effect of the i.h. microinjection of CPP (2 nmol), together with 4-AP (2.1 nmol), on the occurrence of WDS. Values are mean number of WDS/5 min  $\pm$  S.E. for 5 (control) and 6 (CPP) rats. \*  $P < 0.05$ , as compared with the corresponding controls.

Fig. 4. Effect of the i.p. pretreatment with MK-801 (0.25 mg/kg) on the occurrence of WDS induced by the i.h. microinjection of 4-AP (2.1 nmol). Values are mean number of WDS/5 min  $\pm$  S.E. for 9 (control) and 11 (MK-801) rats. \*  $P < 0.05$ , as compared with the corresponding controls.

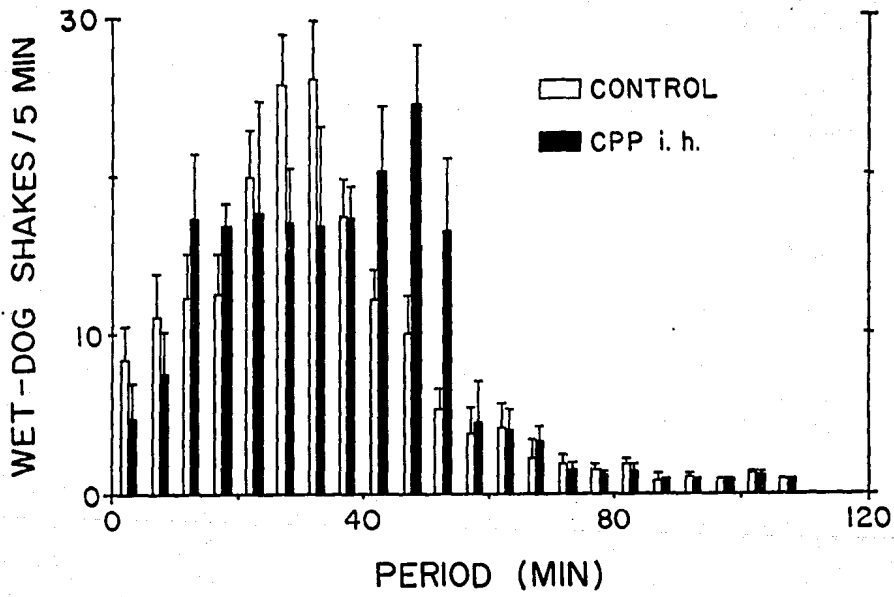
WET - DOG SHAKES / 5 MIN



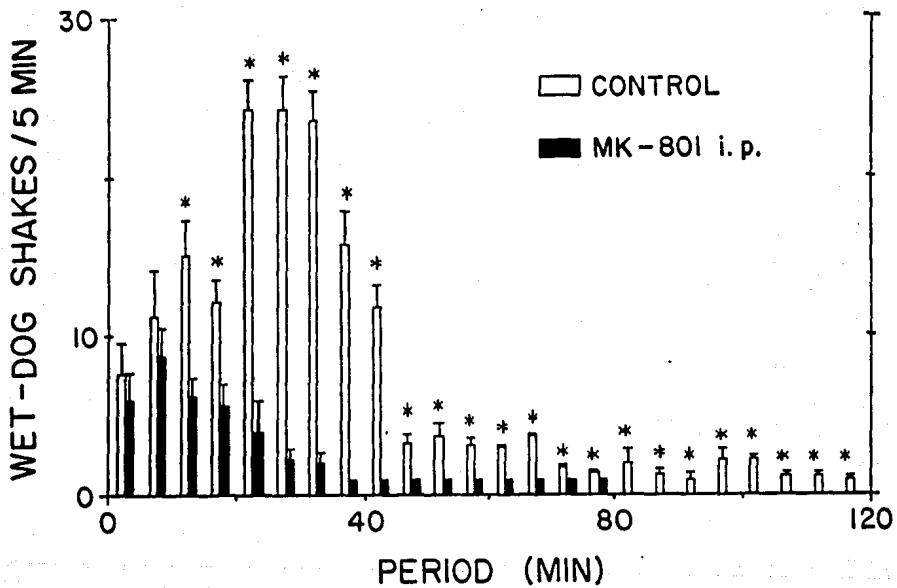




59



60



## VI. DISCUSSION GENERAL

## 1. Efecto protector de los antagonistas de NMDA

De los datos obtenidos en este trabajo, es evidente que los antagonistas competitivos y no competitivos de receptores NMDA tuvieron un efecto protector contra la generación de las SPM y de las CTCG inducidas por la 4-AP. Otros autores han mostrado que el AP-5 es capaz de prevenir las convulsiones producidas por la 4-AP cuando ambos compuestos se administran por vía intracerebroventricular en ratas (Gandolfo et al., 1989). Como se menciona en la discusión del artículo enviado, estos resultados, en conjunto con la demostración de que la 4-AP incrementa la liberación de glutamato en sinaptosomas de cerebro de ratón (Tapia y Sitges, 1982) o de corteza de cuyo (Tibbs et al., 1989) y en rebanadas de estriado de rata (Dolezal y Tucek, 1983), sugieren que la administración in vivo de 4-AP puede provocar una liberación masiva de AAE.

El mecanismo por el cual la 4-AP induce la liberación del glutamato no es muy claro. Algunos autores sugieren que dicha liberación podría darse por un incremento en la entrada de  $Ca^{2+}$  a la terminal presináptica (Jones y Heinemann, 1987; Nicholls y Attwell, 1990; McMahon y Nicholls, 1991) y la consecuente liberación de los AAE. Sin embargo, es importante hacer notar que otros autores no han logrado observar un aumento en la entrada de  $^{45}Ca^{2+}$ , bajo condiciones en que la 4-AP induce la liberación de transmisores en sinaptosomas (Tapia y Sitges, 1982; Tapia et al., 1985), o sólo se ha encontrado un incremento importante con concentraciones mM del compuesto (Pasantes-Morales y Arzate,

1981) por lo que esta explicación no es muy clara.

A pesar de que los antagonistas de los receptores tipo NMDA protegieron contra la generación de las SPM y de las CTCG, ni la aparición de los "síntomas preconvulsivos" ni de las convulsiones límbicas se previnieron por el tratamiento con dichos antagonistas. Un efecto similar se encontró en el modelo experimental con pentilentetrazol (Velisek et al., 1990). Este efecto protector parcial sugiere que existen diferentes mecanismos de generación de las manifestaciones convulsivas, algunos dependientes y otros independientes de receptores NMDA.

El hecho de que los antagonistas de los receptores no-NMDA hayan carecido de efecto sobre los parámetros convulsivos está de acuerdo con la poca participación que tienen estos receptores en la generación de actividad epileptiforme en muchos de los modelos experimentales de epilepsia mencionados en la Introducción.

## 2. Efecto de la 4-AP sobre las corrientes de calcio postsinápticas.

Aunque la entrada de calcio generada por los AAE ocurre principalmente a través del canal iónico acoplado al receptor del NMDA, se ha demostrado que al estimular este receptor se generan corrientes de calcio alternas cuya amplitud se reduce tanto por iones inorgánicos (cobalto y manganeso) como por bloqueadores orgánicos (verapamil y D-600) (Dingledine, 1983). Además, la nitrendipina potencia las convulsiones producidas por N-metil-DL-aspartato (Dolin et al., 1988). Estos datos indican que la

acción despolarizante del NMDA resulta en la apertura de los CCSV y, como se menciona en el apartado 4 de esta discusión, estas corrientes alternas son importantes para explicar el efecto potenciador de las DHP.

No todos los efectos de la 4-AP son explicables a través de un efecto presináptico y, por lo tanto, por la liberación de transmisores. Existen datos que muestran que la 4-AP es capaz de provocar hiperexcitación neuronal a través de un mecanismo diferente. Se ha demostrado que la 4-AP incrementa las corrientes de calcio a nivel postsináptico en las dendritas de las neuronas piramidales (Jones y Heinemann, 1987), en las dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1 (Lee et al., 1986), en dendritas de neuronas talámicas de cuyo (Johansen y Llinás, 1984), en dendritas de las células de Purkinje de aves (Llinás y Hess, 1976) y en neuronas de médula espinal de ratón (Rogawski y Barker, 1983).

Por lo anterior es factible pensar que la 4-AP, además del efecto estimulante de la liberación de glutamato, actúa sobre los CCSV postsinápticos para inducir un influxo del ión que contribuiría de manera importante a la generación de un foco epileptogénico.

### 3. Efecto potenciador de las dihidropiridinas.

De los resultados obtenidos previamente (Fragoso-Veloz et al., 1990) concluimos que las dihidropiridinas potencian la actividad convulsiva provocada por la administración i.p. e i.h. de la 4-AP.

Los CCSV se han dividido en tres tipos: T (transient), L (long lasting) y N (neuronal) (Nowycky et al., 1985) y son los tipo L los únicos canales que responden a las DHP (Nowycky et al., 1985; Miller, 1987). Se ha sugerido que los canales N son los que están importantemente involucrados en la liberación de transmisores (Hirning et al., 1988; Martin y Magistretti, 1989; Sreckelsen et al., 1990; Horne y Kemp, 1991). Aunque a nivel presináptico existe una gran cantidad de CCSV con muy alta afinidad a las DHP, su papel fisiológico no es bien conocido y no está muy claro si son canales funcionales (Thayer et al., 1986), de tal manera diversos autores han concluido que no participan en el mecanismo de liberación de transmisores (Ogura y Takahashi, 1984; Perney et al., 1986; Massieu y Tapia, 1988; Hirning et al., 1988; Obaid et al., 1989; Martin y Magistretti, 1989).

Por otra parte, en diversos tipos neuronales, localizados a nivel postsináptico, también existen CCSV sensibles a las DHP (Docherty y Brown, 1986; Bolger et al., 1987; Gähwiler y Brown, 1987) que podrían tener importancia fundamental en la regulación de la excitabilidad neuronal y es factible pensar que es a este nivel en donde las DHP pueden tener un efecto importante después de su administración *in vivo*. Diversas observaciones experimentales han demostrado que las DHP calcio-antagonistas tienen un efecto como "agonistas parciales". Por ejemplo en rebanadas de corteza de rata, la nifedipina por sí misma provoca un influjo de  $Ca^{2+}$  al interior neuronal (Riveros y Orrego, 1986).



y en el músculo liso de arteria coronaria de cerdos la nitrendipina en muy bajas concentraciones ( $10^{-9}$  M) aumenta la contracción y el influjo de  $Ca^{2+}$  (Miwa y Schwartz, 1987). De lo anterior se concluye que la caracterización de las DHP como agonistas o antagonistas no es muy estricta y que es necesario introducir el concepto de "agonistas parciales".

Respecto a la potenciación de la actividad convulsiva por DHP en nuestro modelo, otros autores han encontrado resultados similares. Por ejemplo, la nitrendipina incrementa la actividad convulsiva inducida en ratas por la administración de N-metil-DL-aspartato (Dolin et al., 1986) y de los ácidos kainico y quinolinico (Vezzani et al., 1988). De estos resultados se concluye que las DHP tienen un efecto potenciador de las convulsiones provocadas por sobreestimulación directa del sistema de AAE.

#### 4. Modelo propuesto.

La hipótesis que se propone para tratar de integrar los resultados obtenidos en el artículo enviado a publicación, parte de esta tesis, y el artículo publicado anteriormente por nosotros (Fragoso-Veloz et al., 1990) es la siguiente (Fig. 3) :

La administración i.p. e i.h. de la 4-AP induce la liberación masiva de AAE que interactúan con sus receptores. Además, la 4-AP probablemente facilita la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales sensibles a voltaje tipo L. Ambos efectos resultan en la despolarización neuronal, que a su vez activa corrientes de calcio a través de los CCSV. Estos cambios serían

los responsables de la aparición de un foco epileptogénico que gradualmente se desarrollará hasta producir convulsiones generalizadas.

El efecto potenciador de las DHF se puede explicar precisamente a nivel de los CCSV, en la membrana del soma neuronal, en donde las DHF ejercen el efecto como "agonistas parciales" ya mencionado. Cuando no se ha administrado 4-AP los CCSV se hallan en estado de reposo y es por ello que en esta condición las DHF no tienen ningún efecto a nivel conductual ni electroencefalográfico (Dolin et al., 1988, Fragozo-Veloz et al., 1990). Por otra parte, como ya se discutió, los antagonistas de NMDA protegen porque bloquean la unión de los AAE con sus receptores y de esta manera previenen el exceso de transmisión glutamatérgica.

Es evidente que aun faltan por realizar más experimentos que den luz acerca de nuestra hipótesis. Por ejemplo, sería interesante estudiar si un bloqueador de los canales de calcio tipo N ( $\omega$ -conotoxina) impide la liberación de glutamato in vitro y cual sería su efecto en la generación de convulsiones y SPM inducidas por la 4-AP. Asimismo, se podrían hacer cuantificaciones por medio de técnicas de fluorescencia con indicadores de calcio como el Fluo-3 o Fura-2, que permiten medir cambios en la concentración intracelular de calcio, bajo el efecto de la 4-AP, de los antagonistas de AAE y de las DHF. También se podría hacer un estudio electroencefalográfico del efecto de los antagonistas de AAE sobre la acción de la 4-AP en

diversas estructuras cerebrales, así como medir la liberación endógena de glutamato y otros aminoácidos *in vivo*, con técnicas de microdialisis, en estas condiciones experimentales.

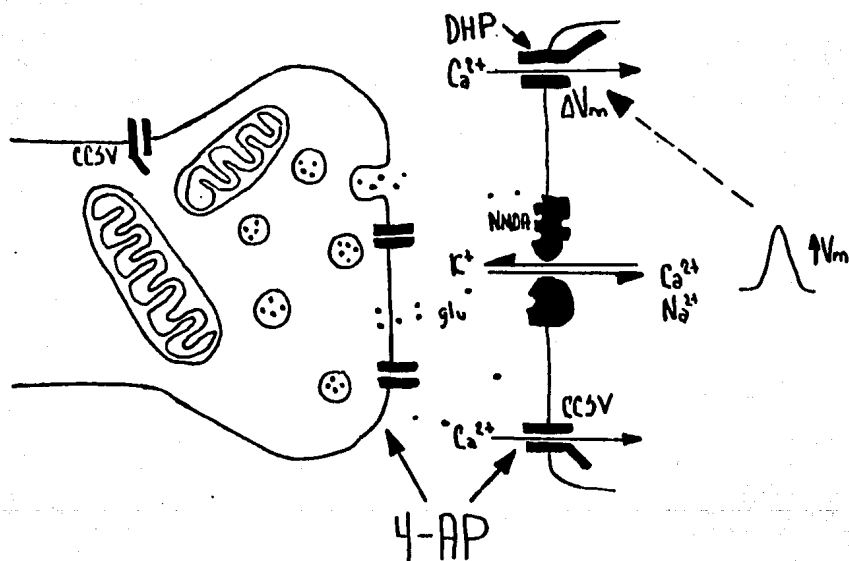


Fig. 4. Modelo propuesto para explicar el efecto potenciador de las dihidropiridinas y protector de los antagonistas de NMDA en la actividad convulsiva inducida por la 4-AP.

## VII. REFERENCIAS

- Agoston S., Salt P.J., Erdmann W., Hilkemeier T., Bencini A. y Langrehr D. 1990, Antagonism of ketamine-diazepam anaesthesia by 4-aminopyridine in human volunteers. Br. J. Anaesth. 52. 367-370.
- Anderson T., Schultzberg M., Schwarz R., Löve A., Wickman C. y Kristensson K. 1991, NMDA-receptor antagonists prevents measles virus-induced neurodegeneration. European J. Pharmacol. 3. 66-71.
- Arzate M. E., Morán J. y Pasantes-Horales H. 1986, Inhibitory effect of taurine on 4-aminopyridine-stimulated release of labelled dopamine from striatal synaptosomes. Neuropharmacology. 25. 689-694.
- Ashton D., Willems R., De Prins E. y Wauquier A. 1988, Selective inhibition of synaptic versus non-synaptic epileptogenesis by NMDA antagonists in the in vitro hippocampus. Epilepsy Res. 2. 219-222.
- Avoli M., Louvel J., Fumain R. y Olivier A. 1987, Seizure-like discharges induced by lowering  $[Mg^{2+}]_o$  in the human epileptogenic neocortex maintained in vitro. Brain Res. 417. 199-203.
- Barnes D. M. 1988, NMDA receptors trigger excitement. Science. 239. 254-256.
- Bennett M.V.L., McGurk J.F., Lerma J. y Zukin R. S. 1991, Phencyclidine- $Mg^{2+}$  competition and polyamine potentiation at NMDA receptors. En: NMDA receptor related agents: biochemistry, pharmacology and behavior. (Kameyama T., Nabexhima T. y Domino E. F. eds). NPP Books, 414 pp.

- Berger S. G., Waser P.G. y Sin-Ren C. 1989. Distribution of the 4-aminopyridine derivative 3-methoxy-4-aminopyridine in mice. Neuropharmacology. 28. 191-194.
- Bolger G. T., Basile A. S., Janovsky A. J., Paul S. M. y Skolnick F. 1987. Regulation of dihydroxyriptide calcium antagonist binding sites in the rat hippocampus following neurochemical lesions. J. Neurosci. Res. 17. 285-290.
- Bostock H., Sears T. A. y Sherratt R. M. 1981. The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. J. Physiol. 313. 301-315.
- Choi D. W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron. 1. 623-634.
- Collingridge G. L. y Singer W. 1990. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. Trends. Pharmac. Sci. 11. 290-296.
- Croucher M. J., Collins J. F. y Meldrum B. S. 1982. Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. Science. 216. 899-901.
- Czuczwar S. J. y Meldrum B. 1982. Protection against chemically induced seizures by 2-imino-7-phosphonoheptanoic acid. European J. Pharmacol. 83. 335-338.
- Damsma G., Biessels F. T. M., Westerink B. H. C., De Vries J. y Horn A. S. 1988. Differential effects of 4-aminopyridine and 2,4-diaminopyridine on the in vivo release of acetylcholine and dopamine in freely moving rats

- measured by intrastriatal dialysis. European J. Pharmacol. 145, 15-20.
- Davidson M., Zemishlany Z., Mohs R. C., Horvath T. B., Powchik P., Blass J. B. y Davis K. L. 1988, 4-aminopyridine in the treatment of Alzheimer's Disease. Biol. Psychiatry. 23, 485-490.
- Dingledine R. 1983, *n*-Methyl aspartate activates voltage-dependent calcium conductance in rat hippocampal pyramidal cells. J. Physiol. 343, 385-405.
- Dingledine R., Hynes N. A. y King G. L. 1986, Involvement of *N*-Methyl-D-aspartate receptors in epileptiform bursting in the rat hippocampal slices. J. Physiol. 380, 175-189.
- Dingledine R., McBain C. J. y McNamara J. O. 1990, Excitatory amino acid receptors in epilepsy. Trend. Pharmacol. Sci. 11, 334-338.
- Docherty R. J. y Brown D. A. 1986, Interaction of 1,4-dihydropyridines with somatic Ca currents in hippocampal CA<sub>1</sub> neurones of the guinea pig in vitro. Neurosci. Lett. 70, 110-115.
- Dolezal V. y Tucek S. 1983, The effects of 4-aminopyridine and tetrodotoxin on the release of acetylcholine from rat striatal slices. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 323, 90-95.
- Dolin S. J., Hunter A. B., Halsey M. J. y Little H. J. 1988, Anticonvulsant profile of the dihydropyridine calcium channel antagonists, nitrendipine and nimodipine. European J. Pharmacol. 152, 19-27.

- Feria V. A., Martinez D. y Rubio-Donnadieu F. 1986. Epilepsia, un enfoque multidisciplinario. Trillas, 382 pp.
- Fisher R. S. y Covey J. T. 1991. Neurotransmitters and epilepsy. Wiley-Liss, 260 pp.
- Foldes F. F., Ludvig N., Nagashima H. y Vizi E. S. 1988. The influence of aminopyridines on Ca-dependent evoked release of acetylcholine from rat cortex slices. Neurochem. Res. 13, 761-764.
- Fragoso-Veloz J., Massieu L., Alvarado R. y Tapia R. 1990. Seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine, and their modification by nifedipine. European J. Pharmacol. 178, 275-284.
- Gähwiler B. H. y Brown D. A. 1987. Effects of dihydroxyridine on calcium currents in CA<sub>3</sub> pyramidal cells in slice of rat hippocampus. Neuroscience. 3, 731-738.
- Gale K., Zhong P., Miller L. P. y Murray T. F. 1988. A crucial role of excitatory amino acids in the initiation and control of convulsions elicited from "area tempestas". En: Frontiers in excitatory amino acid research. Alan R. Liss, Inc. 260 pp.
- Galindo J. y Rudomin P. 1978. Facilitation of synaptic activity in the frog spinal cord produced by 4-aminopyridine. Neurosci. Lett. 10, 299-304.
- Galvan M., Grafe P. y Bruggencate G. T. 1982. Convulsant actions of 4-aminopyridine on the guinea-pig olfactory cortex. Brain Res. 241, 75-86.



- Gandolfo G., Gottesman C., Bidard J. N. y Lazdunski M. 1989. Ca channel blockers prevent seizures induced by a class of K channel inhibitors. European J. Pharmacol. 160. 173-177.
- Gean P. W. y Shindick-Gallagher P. 1988. Epileptiform activity induced by magnesium-free solution in slices of rat amygdala: Antagonism by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. Neuropharmacology. 6. 557-562.
- Giulian D., Vaca K. y Noonan D. A. 1990. Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. Science. 250. 1593-1596.
- Headley P. M. y Grillner S. 1990. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. Trends. Pharmac. Sci. 11. 205-211.
- Hirning L. D., Fox A. P., McCleskey E. W., Olivera B. M., Theyer S. A., Miller R. J. y Tsien R. W. 1988. Dominant role of N-type  $Ca^{2+}$  channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. Science. 239. 57-60.
- Horne A. L. y Kemp J. A. 1991. The effect of  $\omega$ -conotoxin GVIA on synaptic transmission within the nucleus accumbens and hippocampus of the rat in vitro. Br. J. Pharmacol. 103. 1733-1739.
- Jankowska E., Lundberg A., Rudomin P. y Sykova E. 1977. Effects of 4-aminopyridine on transmission in excitatory and inhibitory synapses in the spinal cord. Brain Res. 136. 387-392.

- Johansen H. y Llinás R. 1984. Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an in vitro study. J. Physiol. 349, 205-226.
- Johnson J. W. y Ascher P. 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature. 325. 529-531.
- Jones A. W., Croucher M. J., Meldrum B. S. y Watkins J. C. 1984. Suppression of audiogenic seizures in DBA/2 mice by two new dipeptide NMDA receptor antagonists. Neurosci. Lett. 45, 157-161.
- Jones R. y Heinemann U. 1987. Pre- and postsynaptic  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  fluxes in area CA1 of the rat hippocampus in vitro: effects of  $Ni^{2+}$ , TEA and 4-AP. Exp. Brain Res. 68, 205-209.
- Jones R. E., Heron J. R., Foster D. H., Snelgar R. S. y Mason R. J. 1985. Effects of 4-aminopyridine in patients with multiple sclerosis. J. Neurol. Sci. 60, 353-362.
- Kirperkar M., Kirperkar S. M. y Prat J. C. 1977. Effect of 4-aminopyridine on release of noradrenaline from the perfused cat spleen by nerve stimulation. J. Physiol. 272, 517-528.
- Kita T., Kita H. y Kitai S. T. 1985. Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. Brain Res. 361, 10-18.
- Kulkarni S. K. y Ticku M. K. 1989. Interaction between gabaergic anticonvulsants and the NMDA receptor antagonist MK-801 against MES- and picrotoxin-induced convulsions in rats. Life Sci. 44, 1317-1323.

- Leander S., Arner A. y Johansson B. 1977, Effects of 4-aminopyridine on mechanical activity and noradrenaline release in the rat portal vein in vitro. European J. Pharmacol. 46, 351-361.
- Lee W. L., Anwyl R. y Roebn M. 1986, 4-aminopyridine-mediated increase in long-term potentiation in CA<sub>1</sub> of the rat hippocampus. Neurosci. Lett. 70, 106-109.
- Llinás R. y Hess R., 1976. Tetrodotoxin-resistant dendritic spikes in avian Purkinje cells., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 2520-2523.
- Lodge D. y Collingridge G. 1990. Pharmacology of excitatory amino acids. Trend. Pharmacol. Sci. 11, 494-495.
- Lodge D., Jones M. y Fletcher E. 1989. Non-competitive antagonists of N-methyl-D-aspartate. En: The NMDA receptor (Watkins J. C. y Collingridge G. L. eds), Oxford University Press, 242 pp.
- Loeb C. L., Patrone A., Besio G., Balestrino M. y Mainardi P. 1990. The excitatory amino acid antagonist aminophosphono-valeric acid (APV) provides protection against penicillin-induced epileptic activity in the rat. Epilepsy Res. 6, 249-251.
- López A. M., 1983. Acidos glutámico y aspártico. En: Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. (Pasantes-Morales H. y Aréchiga H. eds), UNAM, 189 pp.
- Lundh H. 1978, Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. Brain Res. 153, 307-318.

- Lundh H., Nilsson O. y Rosén I. 1977. 4-aminopyridine- a new drug tested in the treatment of Eaton-Lambert syndrome. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 40. 1109-1112.
- Lundh H., Nilsson O. y Rosén I. 1979. Effects of 4-aminopyridine in myasthenia gravis. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 42. 171-175.
- Lundh H. y Thesleff S. 1977. The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals. European J. Pharmacol. 42. 411-412.
- Marshall I. G., Lambert J. J. y Durant N. N. 1979. Inhibition of aminopyridine-induced activity in skeletal muscle by tetrodotoxin and by magnesium. European J. Pharmacol. 54. 9-14.
- Martin J. L. y Magistretti P. J. 1989. Pharmacological studies of voltage-sensitive  $Ca^{2+}$ -channels involved in the release of vasoactive intestinal peptide evoked by  $K^+$  in mouse cerebral cortical slices. Neuroscience. 30. 423-431.
- Massieu L. y Tapia R. 1988. Relationship of dihydropyridine binding sites with calcium-dependent neurotransmitter release in synaptosomes. J. Neurochem. 51. 1184-1189.
- Mayer M. L., Westbrook G. L. y Guthrie P. B. 1984. Voltage-dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurones. Nature. 309. 261-263.
- McDonald J. W. y Johnston M. V. 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. Brain Res. Rev. 15. 41-70.

- McMahon H. T y Nicholls D. G. 1991. Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals: Evidence for biphasic release and triggering by localized  $Ca^{2+}$ . J. Neurochem. 56. 86-94.
- McNamara J. O., Russell R. D., Rigsbee L. y Bonhaus D. W. 1988. Anticonvulsant and antiepileptogenic actions of MK-801 in the kindling and electroshock models. Neuropharmacology. 27. 563-568.
- Meldrum B. S., Croucher M. J., Badman G. y Collins J. F. 1983. Antiepileptic action of excitatory amino acid antagonists in the photosensitive baboon. Papio papio. Neurosci. Lett. 39. 101-104.
- Meldrum B. S. y Garthwaite J. 1990. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends Pharmac. Sci. 11. 379-387.
- Meyer F. B., Anderson R. E., Sundt T. M. y Sharbrough F. W. 1986a. Selective central nervous calcium channel blockers—a new class of anticonvulsant agents. Mayo Clin. Proc. 61. 239-247.
- Meyer F. B., Anderson R. E., Sundt T. M., Yaksh T. L. y Sharbrough F. W. 1987. Suppression of pentylenetetrazole seizures by oral administration of a dihydropyridine  $Ca^{2+}$  antagonist. Epilepsia. 28. 409-414.
- Meyer F. B., Tally P. W., Anderson R. E., Sundt T. M., Yaksh T. L. y Sharbrough F. W. 1986b. Inhibition of electrically induced seizures by a dihydropyridine calcium channel blocker. Brain Res. 384. 180-183.

- Millan M. H., Patel S., Mello L. M. y Meldrum E. S. 1986. Focal injection of 2-amino-7-phosphonooxepanoic acid into prepiriform cortex protects against pilocarpine-induced limbic seizures. Neurosci. Lett. 70, 69-74.
- Miller R. J. 1987. Multiple calcium channels and neuronal function. Science. 235, 46-52.
- Miwa K. y Schwartz A. 1987. Paradoxical augmentation of (-)BAY K 8644-induced calcium influx by nitrendipine. Bioch. Biophys. Res. Comm. 148, 1-18.
- Molgó J., Lemeignan M. y Lechat F. 1977. Effects of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction. J. Pharmacol. Exp. Ther. 203, 653-655.
- Monaghan D. T., Bridges R. J. y Cotman C. W. 1989. The excitatory amino acid receptors: Pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 365-402.
- Monaghan D. T. y Cotman C. W. 1982. The distribution of [<sup>3</sup>H] kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. Brain Res. 252, 91-100.
- Monaghan D. T. y Cotman C. W. 1985. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[<sup>3</sup>H]glutamate-binding sites in rat brain. J. Neurosci. 5, 2909-2919.
- Morimoto K. 1989. Seizure-triggering mechanisms in the kindling model of epilepsy: Collapse of GABA-mediated inhibition and activation of NMDA receptors. Neurosc. Biobehav. Rev. 13, 253-260.

- Noriyoshi K., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S. 1991. Molecular cloning y characterization of the rat NMDA receptor. Nature. 354. 31-37.
- Morocutti C., Pierelli F., Sanarelli L., Stefano E., Peone A. y Mattioli G. L. 1986. Antiepileptic effects of a calcium antagonist (Nimodipine) on Cefazolin-induced epileptogenic foci in rabbits. Epilepsia. 27. 498-503.
- Morris R. G. M., Anderson E., Lynch G. S. y Gaudry M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. AP5. Nature. 319. 774-776.
- Murray N. M. F. y Newsom-Davis J. 1981. Treatment with oral 4-aminopyridine in disorders of neuromuscular transmission. Neurology. 31. 265-271.
- Nicholls D. y Attwell D. 1990. The release and uptake of excitatory amino acids. Trends. Pharmacol. Sci. 11. 462-468.
- Nowycky M. C., Fox A. P. y Tsien R. W. 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. Nature. 316. 440-443.
- Obaid A. L., Flores R. y Salzberg B. M. 1989. Calcium channels that are required for secretion from intact nerve terminals of vertebrates are sensitive to  $\omega$ -conotoxin and relatively insensitive to dihydropyridines. J. Gen. Physiol. 93. 715-729.
- Ogura A. y Takahashi M. 1984. Differential effect of a dihydropyridine derivative to  $Ca^{2+}$  entry pathways in neuronal preparations. Brain Res. 310. 323-330.

- Olney J. W. 1990. Excitotoxic amino acid and neuropsychiatric disorders. Annul. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30, 47-71.
- O'Neill S. K. y Bolger T. 1990. The effects of dihydropyridine calcium channel modulators on pentylentetrazole convulsions. Brain Res. Bull. 25, 211-214.
- Parducz A., Dunant Y., Loctin F., Muller D. y Garcia-Segura L. M. 1987. Presynaptic effects of 4-aminopyridine and changes following a single giant impulse at the Torpedo nerve-electroplaque junction. Neuroscience. 22, 709-718.
- Pasantes-Morales H. y Arzate M. E. 1981. Effect of taurine on seizures induced by 4-aminopyridine. J. Neurosci. Res. 6, 465-474.
- Pasantes-Morales H., Arzate M. E., Guesada O. y Huxtable R. J. 1987. Higher susceptibility of taurine-deficient rats to seizures induced by 4-aminopyridine. Neuropharmacology. 26, 1721-1725.
- Perney T. M., Hirning L. D., Leeman S. E. y Miller R. J. 1986. Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 6656-6659.
- Piredda S. y Gale K. 1986. Role of excitatory amino acid transmission in the genesis of seizure elicited from the deep prepiriform cortex. Brain Res. 377, 205-210.
- Ransom R. W. y Deschenes N. L., 1990. Polyamines regulate glycine interaction with the N-methyl-D-aspartate receptor. Synapse. 5, 284-288.



- Reynolds I. J. y Miller R. J. 1988. Multiple sites for the regulation of the N-methyl-D-aspartate. Mol. Pharmacol. 33, 581-584.
- Riveros N. y Orrego F. 1986. N-Methylaspartate-activated calcium channels in rat brain cortex slices. Effect of calcium channel blockers and of inhibitory and depressant substances. Neuroscience. 17, 541-546.
- Rogawski M. A. y Barker J. L. 1983. Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons. Brain Res. 280, 180-185.
- Rubio-Donnadieu F. 1990. Epilepsia CAMELICE. Programa Ciba-Geigy de información sobre epilepsia. 57 pp.
- Sander J. W. A. S. y Trevisol-Bittencourt P. C. 1990. Nifedipine as an add-on drug in the management of refractory epilepsy. Epilepsy Res. 6, 82-84.
- Schafer E. W., Brunton R. B. y Cunningham D. J. 1973. A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridine to birds and mammals. Toxicol. Appl. Pharmacol. 26, 532-538.
- Schramm M., Thomas G., Towart R. y Franckowiak G. 1983. Activation of calcium channels by novel 1,4-dihydropyridines. A new mechanism for positive inotropics or smooth muscle stimulants. Arzneim.-Forsch. Drug Res. 33, 1268-1272.
- Shelton R. C., Grebb J. A. y Freed W. J. 1987. Induction of seizures in mice by intracerebroventricular administration

- of the calcium channel agonist  $\text{DAY k 8644}$ . Brain Res. 402, 399-402.
- Simon R. P., Swan J. H., Griffiths T. y Meldrum B. S. 1984. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. Science. 226, 850-852.
- Skolnick P., Marvizón J. C. G., Jackson B. W., Nonn J. A., Rice K. C. y Lewin A. H. 1989. Blockade of N-methyl-D-aspartate induced convulsions by 1-aminocyclopropanecarboxilates. Life Sci. 45, 1647-1655.
- Spreckelsen S., Lollike K. y Treiman M. 1990.  $\text{Ca}^{2+}$  and vasopressin release in isolated rat neurohypophysis: differential effects of four classes of  $\text{Ca}^{2+}$  channel ligands. Brain Res. 514, 68-76.
- Spyker D. A., Lynch C. L., Shabanowitz J. y Sinn J. A. 1980. Poisoning with 4-aminopyridine: Report of three cases, Clin. Toxicol. 16, 487-497.
- Stasheff S. F., Anderson W. W., Clark S. y Wilson W. A. 1989. NMDA antagonists differentiate epileptogenesis from seizure expression in an in vitro model. Science. 245, 648-651.
- Tapia R. 1982. Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in mice by 4-aminopyridine, guanidine and lanthanum. Neurosci. Lett. 30, 73-77.
- Tapia R., 1983. El ácido  $\gamma$ -amino butírico. En: Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. (Pasantes-Morales H. y Aréchiga H. eds), UNAM. 189 pp.

- Tapia R. y Sitges M. 1982. Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. Brain Res. 250, 291-294.
- Tapia R., Sitges M. y Morales E. 1985. Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. Brain Res. 361, 373-382.
- Thayer S. A., Murphy S. N., Miller R. J. 1986. Widespread distribution of dihydropyridine-sensitive calcium channels in the central nervous system. Mol. Pharmacol. 30, 505-509.
- Thesleff S. 1980. Aminopyridines and synaptic transmission. Neuroscience. 5, 1413-1419.
- Tibbs G. R., Dolly J. G. y Nicholls D. G. 1989. Dendrotoxin, 4-aminopyridine, and  $\beta$ -Bungarotoxin act at common loci but by two distinct mechanisms to induce Ca-dependent release of glutamate from Guinea-Pig cerebrocortical synaptosomes. J. Neurochem. 52, 201-206.
- Turski L., Klockgether T., Sontag K., Herrling P. L. y Watkins J. C. 1987. Muscle relaxant and anticonvulsant activity of 3-(( $\pm$ )-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-L-phosphonic acid, a novel N-methyl-D-aspartate antagonist, in rodents. Neurosci. Lett. 73, 143-148.
- Uges D. R. A., Sohn Y. J., Greijdanus B., Scaf A. H. J. y Agoston S. 1982. 4-aminopyridine kinetics. Clin. Pharmacol. Ther. 31, 587-593.
- Velízek L., Kusá R., Kulonová M. y Mares F. 1990. Excitatory amino acid antagonists and pentylenetetrazol-induced seizures

- during ontogenesis. I.: The effects of 2-amino-7-phosphonoheptanoate. Life Sci. 46, 1347-1357.
- Vezzani A., Serafini M. A., Stasi M. A., Caccia S., Conti I., Tridico R. V. y Samanin R. 1988a. Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 249, 278-283.
- Vezzani A., Wu H. Q., Stasi M. A., Angelico P. y Samanin R. 1988b. Effect of various calcium channel blockers on three different models of limbic seizures in rats. Neuropharmacology. 27, 451-458.
- Vizi E. S., Dijk J. V. y Foldes F. F. 1977. The effect of 4-aminopyridine on acetylcholine release. J. Neural Transm. 41, 265-274.
- Watkins J. C. 1989. The NMDA receptor concept: origins and development. En: The NMDA receptor. (Watkins J. C. y Collingridge G. L. eds), Oxford University Press.
- Wesseling H., Agoston S., Van Dam G. B. P., Pasma G., DeWit D. J. y Havinga H. 1984. Effects of 4-aminopyridine in elderly patients with Alzheimer's Disease. New. Engl. J. Med. 310, 988-989.
- Westbrook G. L. y Mayer M. L. 1987. Micromolar concentrations of  $Zn^{2+}$  antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. Nature. 328, 640-643.
- Wieloch T. 1985. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. Science. 230, 681-683.

Williams K., Romano C. y Molinoff P. B. 1989. Effects of polyamines on the binding of [<sup>3</sup>H]-MK-801 to the N-methyl-D-aspartic acid receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. Mol. Pharmacol. 36, 575-581.

Witkins J. M. y Tortella F. C. 1991. Modulators of N-methyl-D-aspartate protect against diazepam- or phenobarbital-resistant cocaine convulsions. Life Sci. 48, PL-51- PL-56.