



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Efecto de la microinyección de difenilhidantoína en el  
tallo cerebral sobre las crisis producidas por  
electrochoque en el ratón.”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

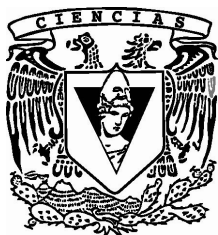
**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**JUAN CARLOS GUAUXOCHITL CRUZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. RAÚL HUMBERTO ALVARADO CALVILLO**



**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Guauchoitl

Cruz

Juan Carlos

55 58 42 93

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

085226498

### 2. Datos del tutor

Dr

Raúl Humberto

Alvarado

Calvillo

### 3. Datos del sinodal 1

Dra

María Luisa

Fanjul

Peña

### 4. Datos del sinodal 2

Dr

Gabriel

Gutiérrez

Ospina

### 5. Datos del sinodal 3

Dr

Joaquín

Manjarrez

Marmolejo

### 6. Datos del sinodal 4

M en C

Juan Carlos

Zamora

Cunningham

### 7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la microinyección de difenilhidantoína en el tallo cerebral sobre las crisis producidas por electrochoque en el ratón

110 p

2011

## ÍNDICE

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
ANTECEDENTES.....	9
1 EPILEPSIA.....	9
1.1 Clasificación de la Epilepsia.....	9
2 EL TALLO CEREBRAL.....	11
2.1 Anatomía del Tallo Cerebral.....	11
2.2 La Función del Tallo Cerebral.....	13
2.3 Estudios de Estimulación del Tallo Cerebral.....	14
3 LA FORMACIÓN RETICULAR.....	15
3.1 Anatomía de la Formación Reticular.....	15
3.2 Funciones de la Formación Reticular.....	17
3.3 Vías de la Formación Reticular.....	19
3.4 Drogas Antiepilépticas y Formación Reticular.....	22
3.5 Estudios de Estimulación de la Formación Reticular.....	25

4. LA SUBSTANCIA NIGRA.....	26
4.1 Función de la Substancia Nigra.....	26
4.2 Vías de la Substancia Nigra.....	27
4.3 Drogas Antiepilépticas y la Substancia Nigra.....	27
5. EPILEPSIA EXPERIMENTAL.....	29
5.1 Características Generales de los Modelos de Epilepsia Experimental.....	29
5.2 Objetivos de los Modelos Epilépticos.....	30
5.3 Modelos Eléctricos.....	35
6. LA DIFENILHIDANTOÍNA COMO ANTIEPILÉPTICO.....	41
6.1 Historia de la Difenilhidantoína.....	41
6.2 Farmacología de la Difenilhidantoína.....	45
6.3 Efectos Adversos.....	51
6.4 Mecanismos de Acción de la Difenilhidantoína.....	57
OBJETIVOS.....	65
METODOLOGÍA.....	66
a) Técnica de Microinyección.....	66
b) Inducción por Electrochoque de Crisis Tónico-clónico Generalizadas.....	66
c) Tratamiento Histológico.....	68

RESULTADOS.....	69
a) Análisis de Resultados para el Grupo con Electrochoque Solo.....	69
b) Porcentaje de Extensión en Diferentes Estructuras del Mesencéfalo.....	70
c) Porcentaje de Extensión en Diferentes Estructuras del Puente.....	73
d) Porcentaje de Extensión en Diferentes Estructuras del Bulbo.....	76
e) Porcentaje de Mortalidad en Diferentes Estructuras del Mesencéfalo.....	79
f) Porcentaje de Mortalidad en Diferentes Estructuras del Puente.....	80
g) Porcentaje de Mortalidad en Diferentes Estructuras del Bulbo.....	81
DISCUSIÓN.....	83
a) Microinyección con Difenilhidantoína y Solución Salina en Relación al Porcentaje de Extensión.....	83
b) Microinyección con Difenilhidantoína y Solución Salina en Relación al Porcentaje de Mortalidad.....	86
c) Asociación de las Estructuras Inyectadas con Difenilhidantoína en Relación a los Parámetros Conductuales de Extensión y Mortalidad.....	87
d) Relación de la Intensidad de Estímulo con los Parámetros Conductuales Presentados en la Cepa NIH.....	88
CONCLUSIONES.....	89
BIBLIOGRAFÍA.....	91

## RESUMEN

La difenilhidantoína (DFH) se utiliza clínicamente para controlar crisis epilépticas, tanto crisis tónico-clónicas generalizadas (CTCG) como crisis parciales, este fármaco no eleva el umbral convulsivo producido por Pentilentetrazol, estricnina o picrotoxina, su característica más significativa es su capacidad de modificar el patrón convulsivo ocasionado por electrochoque (ECH). Su mecanismo de acción es incierto; sin embargo, se han propuesto algunos posibles mecanismos: (a) Reducción de la conducción de  $\text{Na}^+$ , (b) Inhibición postsináptica mediada por GABA, y (c) Reducción de la entrada de  $\text{Ca}^{++}$ . En cuanto a su sitio de acción no existen antecedentes.

Por otro lado, el tallo cerebral se encuentra formado por estructuras cerebrales importantes para la propagación de crisis, y posiblemente también para la acción de drogas anticonvulsivas. Algunos sitios relevantes son la formación reticular, la sustancia nigra y estructuras talámicas, entre otras.

El objetivo del presente trabajo es determinar la acción de la DFH administrada intracerebralmente en distintas estructuras del tallo cerebral, ante crisis inducidas por el modelo de ECH.

Se utilizaron 167 ratones machos de la cepa NIH con un peso de 25-35 g., los cuales se dividieron en tres grupos: Al primer grupo (20 ratones) se le aplicó un ECH, este grupo se utilizó para determinar el umbral convulsivo como se muestra en la **Gráfica 1**, mismo que fue de igual intensidad y duración en los tres grupos de animales. Al segundo grupo (68 ratones) se le inyectó 0.5  $\mu\text{l}$  de solución salina al 0.9%. Al tercer grupo (79 ratones) se le suministró 25  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$  de DFH (Rudefsa) Las inyecciones se realizaron con una cánula calibre 27 de 5 mm de longitud

conectada a una micro jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l, 20 minutos después se les aplicó un ECH por medio de electrodos corneales conectados a un electroestimulador, con una intensidad de 40 mA y una duración de 0.25 seg. A los tres grupos se les valoró el porcentaje de extensión (EXT) y la mortalidad (MOR) después de aplicar el ECH. Al segundo y tercer grupo se les realizaron cortes histológicos y se determinó el sitio de microinyección.

Con la finalidad de facilitar la comprensión de los hallazgos de este trabajo es importante mencionar los siguientes criterios. A mayores porcentajes de EXT menor efecto antiepiléptico del agente inyectado (DFH o solución salina) frente a las crisis ocasionadas por ECH. En cuanto a la valoración del parámetro de MOR, este solo es una valoración de referencia a la modificación del porcentaje de animales muertos por ECH que en el grupo control es de 100%.

Al primer grupo, sólo se suministró ECH, éste mostró 100% de EXT y MOR.

En el segundo grupo la EXT fue de 100% en todas las estructuras tratadas, mientras que el porcentaje de MOR fue de 100% exceptuando a la CI 33%, núcleo reuniens talámico (RE) 67%, formación reticular bulbar (FB) 75%, y formación reticular pontina (FP) 92%.

Se encontró que para el tercer grupo el 100% de EXT fue al inyectarse la cápsula interna (CI), el fascículo longitudinal medio (FL), la formación reticular pontina (FP), el lemnisco lateral (LL), el lemnisco medio (LM), el núcleo rojo (NR), y el tracto tectoespinal (TT) y el porcentaje de EXT menor fue al inyectarse la zona incerta (ZI) con un 33%, lo que indica que en este sitio prevalece una alta protección por la DFH a la crisis inducida por ECH, otras zonas con un porcentaje menor a 100 de EXT fueron el núcleo interpeduncular (IP) con 50%, el núcleo posthipotalámico



(PH) 50%, la formación reticular mesencefálica (FM) 61%, La formación reticular bulbar (FB) 64%, el núcleo reuniens talámico (RE) 67% el núcleo ventral del tálamo (VE) 67%, la sustancia nigra (SN) 71%, el pedúnculo cerebral (PC) 75; en cuanto al porcentaje de MOR tenemos que al inyectarse el FL, el LL, el VE, LM, el NR, y el TT, se manifiesta una nula inhibición a la MOR, ya que todos los ratones perecen, mientras que al inyectarse la formación reticular mesencefálica (FM) (8%) se observó una elevada protección a la MOR, otras estructuras cerebrales con un porcentaje de MOR menor a 100 fueron ZI 33%, IP 50%, PH 50%, SN 57%, CI 33%, RE 67%, PC 50%, FP 53% y FB 64%.

La DFH reduce considerablemente la EXT tónica y la MOR ante el ECH cuando se administra intracerebralmente (unilateral) en ciertas estructuras del tallo cerebral. Sin embargo, es probable que la DFH actúe en otras estructuras cerebrales.

## INTRODUCCION

La epilepsia es una manifestación de disfunción cerebral, de carácter recurrente, que se distingue por la descarga sostenida y anormalmente sincrónica de un grupo de neuronas cerebrales (**Bennewitz, 2009**). Las etiologías son generalmente multifactoriales, por lo que la epilepsia no se considera como una enfermedad específica. Las crisis epilépticas pueden presentarse como complicación de accidentes infecciosos, traumáticos, tumorales, de alteraciones sistémicas, metabólicas como la hipocalcemia o la hiponatremia, de toxicidad por fármacos o de síndromes hereditarios.

Los tratamientos clínicos en epilepsia están basados en estudios de investigación con animales de laboratorio (ratón, rata, gato, babuino, etc.), estudiando la eficacia de los diferentes fármacos antiepilépticos a través de todos los tipos de modelos epilépticos experimentales, dentro de los más importantes se encuentra el de electrochoque (ECH), el cual es muy utilizado para producir crisis tónico-clónico generalizadas (CTCG) o Gran Mal.

Desde un punto de vista farmacológico, la aplicación intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea de todos los fármacos anticonvulsivos implican beneficios en el control de la epilepsia. Sin embargo, la diseminación de la droga en todo el organismo conduce a efectos no deseados en diferentes órganos importantes. Una alternativa a esta situación puede ser la aplicación de estos fármacos en forma directa (intracerebral) al foco epiléptico o en regiones con propiedades antiepilépticas, modificaciones de los fármacos a través de nanopartículas, liposomas, polímeros encapsulados, prodrogas y por medio de modificaciones de la barrera hematoencefálica (**Bennewitz & Saltzman, 2009**).

Este estudio valora la actividad antiepiléptica de la difenilhidantoína (DFH) administrada intracerebralmente en diferentes estructuras del tallo cerebral a través del modelo de ECH en el ratón.

La importancia de este trabajo radica en determinar los sitios intracerebrales donde la DFH actúa como bloqueador de CTCG, así como los sitios donde no ejerce acción anticonvulsiva.

## ANTECEDENTES

### 1. EPILEPSIA

#### 1.1 Clasificación de la Epilepsia

Alrededor de 0.5-1% de la población humana o más de 50 millones de personas en el mundo sufren de algún tipo de desórdenes epilépticos (**Sander & Shovron, 1996**). Las diferentes clasificaciones sobre la epilepsia propuestas para diferenciar los cuadros epilépticos incluyen, como común denominador, el grupo de epilepsias generalizadas y el de epilepsias parciales (focales). Dentro del grupo de epilepsias generalizadas, están las asociadas a descargas en el Electroencefalograma (EEG), las de tipo bilateral, simétrico y sincrónico, las más frecuentes y las más estudiadas son las ausencias y las crisis de tipo Gran Mal.

La definición de epilepsia, que figura en el **Diccionario Mosby de medicina, enfermería y ciencias de la salud (2006)**, menciona que es una enfermedad cerebral crónica que afecta a personas de todos los países. Se caracteriza por ataques recurrentes que son la manifestación física de descargas eléctricas excesivas, súbitas y a menudo breves, de grupos de células cerebrales. Las descargas pueden localizarse en diferentes partes del cerebro.

Los ataques pueden ir desde episodios muy breves de inatención o sacudidas musculares hasta convulsiones intensas y prolongadas. La frecuencia de los episodios es variable, desde uno al año hasta varios al día.

La epilepsia es una de las afecciones reconocidas desde tiempos antiguos, y durante siglos ha estado rodeada por el miedo, el desconocimiento, la discriminación y la estigmatización social que persiste aún en muchos países y puede afectar la

calidad de vida de los pacientes y sus familias. El riesgo de muerte prematura es de dos a tres veces mayor en pacientes epilépticos que en la población general.

Las características clínicas de las epilepsias (crisis Gran Mal, ausencias, mioclonías) y electrográficas (descargas bilaterales, sincrónicas y simétricas) son particulares a estos cuadros.

Dentro de los diferentes tipos de epilepsias, es necesario distinguir entre aquellos sistemas que participan en la fenomenología de las crisis generalizadas de tipo ausencia, y el sustrato anatómico de las crisis de tipo Gran Mal. Dentro de los primeros, el tálamo y la corteza cerebral desempeñan un papel importante, mientras que la formación reticular (FR) del tallo cerebral resulta ser determinante para la generación de las crisis del tipo Gran Mal.

Las crisis parciales están divididas en tres subgrupos: simples, complejas y generalizadas. La crisis parcial simple se caracteriza por la presencia de la conservación de la conciencia normal. La crisis es altamente localizada, semejante al espasmo de un brazo, y está limitado en muchos casos a un solo hemisferio. Las crisis parcialmente complejas están caracterizadas por la alteración de la conciencia, pueden estar precedidas por una crisis parcial simple (aura). Así, un tipo de crisis parcial simple puede progresar fácilmente a una CTCG convirtiéndose así en una crisis generalizada secundaria (**Porter, 1983**).

Las crisis generalizadas son un grupo más heterogéneo que el de las crisis parciales. La más prominente es la CTCG (Gran Mal), en la cual siempre se presenta una rigidez generalizada de músculos con opistótonus (espasmo muscular intenso y prolongado que hace que la espalda se arquee de forma marcada, la cabeza se desplace hacia atrás sobre el cuello, los talones se inclinen hacia atrás sobre las

piernas y los brazos y las manos se flexionen rígidamente en las articulaciones) gradualmente producidos a duración creciente de las fases de relajación. La rigidez tónica (trastorno de endurecimiento o inflexibilidad) cambia a clónica (contracción y relajación muscular repetitiva en rápida sucesión), lo cual gradualmente disminuye y cesa, esta situación entre otros factores generalmente provoca que los pacientes se muestren confusos después de que se manifiesta la crisis.

Las crisis de ausencia por lo general se presentan o inician en niños y adolescentes, y se caracterizan por ser breves (lapsos usualmente de 10-15 seg.), con interrupción de la conciencia al momento de manifestarse la crisis. Este tipo de crisis están frecuentemente acompañadas por moderados espasmos clónicos, usualmente de los párpados, por incremento o decremento del tono muscular.

Finalmente los espasmos infantiles son un síndrome heterogéneo (originado por diversos factores), en el 90% de pacientes afectados empieza antes del año. Las crisis usualmente se manifiestan por ser repentinas y frecuentemente repetitivas, éstas se dan en las extremidades y dorso. Algunos casos son acompañados por retraso mental (**Porter, 1983**).

## **2. EL TALLO CEREBRAL**

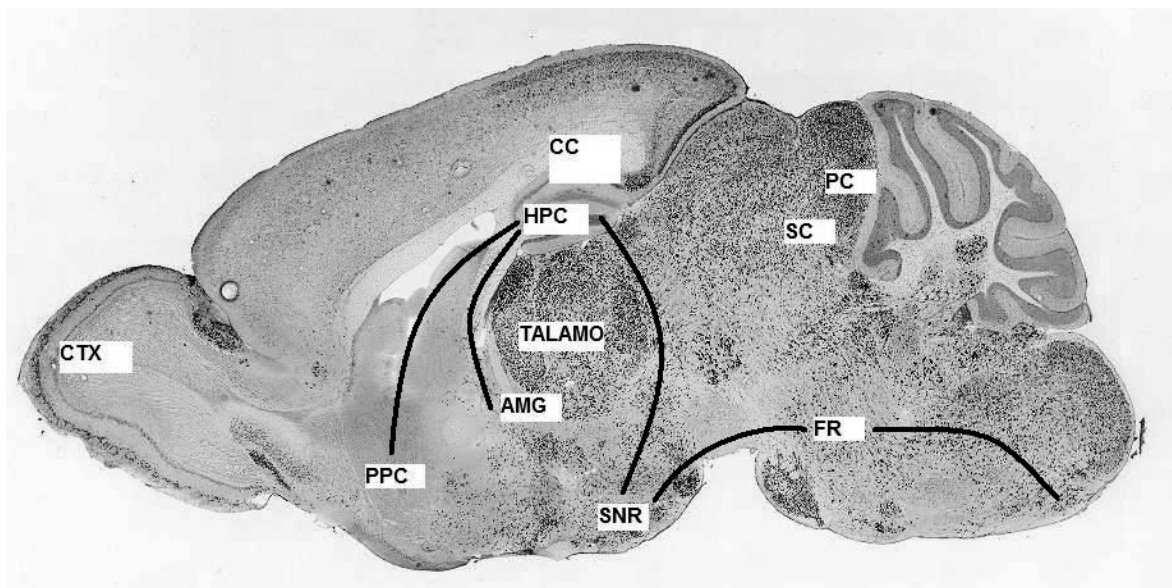
### **2.1 Anatomía del Tallo Cerebral**

El tallo cerebral ha sido relacionado casi siempre con la mediación de crisis generalizadas durante los últimos 30 años. Éste se encuentra distribuido en tres grandes subdivisiones cerebrales (médula, puente, y mesencéfalo), en él se encuentra una masa heterogénea de núcleos y una región fibrosa, la cual se encarga de funciones específicas. La mayor parte de los estudios en epilepsia acerca del tallo

cerebral se concentran en la formación reticular (FR), y en la sustancia nigra (SN), éstos han llegado a ser de gran interés durante los últimos años. Así, se ha encontrado recientemente que los colículos inferiores (CI) juegan un papel importante en la iniciación y propagación de crisis epilépticas (**Faingold, 1987**).

Las estructuras del diencéfalo y prosencéfalo han sido identificadas como zonas importantes en el plexo neuronal, en relación con la vía tallo cerebral. Esto incluye el tracto mamilotalámico, vía tálamo anterior (**Mirski & Ferrendelli, 1984**) y un área adyacente a la corteza preperiforme que ha sido nombrada como el “área tempestas” (**Gale, 1986**). El cuerpo calloso está considerado como la más importante vía transcortical involucrada en la propagación de crisis generalizadas (**Harbaugh & Wilson, 1982**).

En cambio, cuando una sección del tallo cerebral a nivel del mesencéfalo deja intactos el puente, el bulbo (médula oblongata) y las conexiones con la médula espinal a través de sus vías descendentes, por lo general sobreviene un estado de hiperactividad de los reflejos de estiramiento conocido como rigidez de descerebración (**Brodal, 1981; Ruch et al., 1974**). En la **Fig. 1** se ilustran algunas de las principales vías neuronales del tallo cerebral que se involucran en la generación de CTCG en el cerebro de ratón.



**Fig. 1.** Algunas de las principales vías que se involucran en la generación de crisis tónico-clónico generalizadas en el tallo cerebral del ratón. AMG= Amígdala, CC= Cuerpo Caloso, CTX= corteza Cerebral, HPC= Hipocampo, PC= Colículo Inferior, PPC= Corteza Prepiriforme, SC= Colículo Superior, SNR= Substancia Nigra Reticulata, FR= Formación Reticular.

(Faingold, 1987).

## 2.2 La Función del Tallo Cerebral

El tallo cerebral es una extensión compleja de la médula espinal que reúne gran número de circuitos neuronales para controlar la respiración, la función cardiovascular, la función gastrointestinal, los movimientos oculares y el sostén del cuerpo contra la gravedad.

Algunas ideas sobre el papel del tallo cerebral han sido importantes en la investigación de la epilepsia en los últimos 20 años (Gastaut, 1969). La relevancia de la acción de las drogas antiepilépticas sobre el tallo cerebral por el bloqueo de la iniciación y propagación de crisis también es de importancia en la investigación. Otros trabajos proponen que el tallo cerebral juega, incluyendo la FR, juega un papel importante en la iniciación y propagación de las crisis generalizadas incluyendo a la FR (Faingold, 1987). Se sugiere que las crisis se pueden elevar desde estructuras

localizadas en el tallo cerebral. Desde un punto de vista cuantitativo, las regiones pontobulbar y mesencefálica parecen ser las zonas más prominentes involucradas en la génesis de crisis (**Gioanni, 1991**). Las estructuras que modulan las crisis por estímulos de larga intensidad están esencialmente localizadas en el tallo cerebral y en la parte media del tálamo (**Gioanni, 1991**). En el estudio de las crisis puede ser importante la investigación de estas regiones por estimulación eléctrica o química de ciertas estructuras, pudiendo ser inhibidas por la microinyección local de agonistas del GABA o antagonistas de NMDA (**Browning et al., 1989; Duplisse et al., 1974; Faingold et al., 1988; Huxtable & Laird, 1978**).

### **2.3 Estudios de Estimulación del Tallo Cerebral**

Los efectos de la estimulación eléctrica y la acción de la inyección directa de drogas convulsivas dentro del tallo cerebral sugiere que estos núcleos pueden presentar un importante papel en diferentes modelos de crisis generalizadas. Transectos del tallo cerebral, justo sobre el cerebro medio no bloquean la inducción de crisis por Pentilentetrazol (PTZ) o electrochoque (ECH) (**Browning et al., 1989**). Existen evidencias de que el tallo cerebral contiene estructuras o regiones cruciales para la expresión, propagación o iniciación de convulsiones generalizadas. Si la estimulación del tallo cerebral puede producir las crisis, una expectativa podría ser la atenuación subsecuente a la lesión en esta área (**Gerhard, 1987**).

Aunque los métodos de administración de drogas anticonvulsivas han sido refinados (**Cure, 1948**), los principios generales de activación han provisto ser válidos y provechosos en la localización de un foco epiléptico sobre el cerebro (**Walker, 1983**). En numerosos estudios se utiliza la administración sistémica de



todas las drogas anticonvulsivas y microinyecciones de estos agentes en núcleos específicos del tallo cerebral, apoyando la idea de que los núcleos del tallo cerebral pueden inhibir las crisis (**Faingold & Browning, 1987<sup>a</sup>, 1987<sup>b</sup>**).

### **3. LA FORMACION RETICULAR**

#### **3.1 Anatomía de la Formación Reticular**

La FR es una parte filogenéticamente antigua. Se localiza en el bulbo, la protuberancia y el mesencéfalo. Está formada por diversos grupos celulares y sistemas de fibras que viajan alrededor y a través de los grupos nucleares, creando una red que inspiró el nombre de formación reticular (**Lawrence et al., 1982**).

La extensión de la FR empieza en el extremo superior de la médula y se extiende: (a) hacia arriba siguiendo la porción central del tálamo, (b) al hipotálamo, y (c) a otras zonas vecinas del tálamo. El extremo inferior de la FR se continúa con las células internunciales de la médula; de hecho, la FR del tallo cerebral funciona en una forma muy similar a como lo hacen las neuronas intercaladas de las porciones intermediolaterales de la sustancia gris medular.

Dispersas por toda la FR hay neuronas motoras y sensoriales; sus dimensiones varían de muy pequeñas a muy grandes. Las neuronas pequeñas constituyen el mayor número; tienen axones breves que establecen conexiones múltiples con la propia FR. Las neuronas voluminosas son principalmente de función motora y sus axones suelen bifurcarse casi inmediatamente: una división se extiende hacia abajo, a la médula espinal; la otra hacia arriba, al tálamo u otras regiones basales del diencefalo. En general, las porciones mediales de la FR tienden a poseer más

función motora, mientras que las porciones laterales tienden a ser de función sensorial o asociativa (**Fromm, Faingold, Browning & Burnham, 1987<sup>a</sup>**).

Un hecho general de la organización de la FR es que puede ser subdividida de la siguiente forma: los dos tercios mediales contienen células grandes y constituyen la región efectora principal; el tercio lateral se compone de células pequeñas y la línea media (rafé) constituye la región donde las células producen serotonina que luego es diseminada en el resto del encéfalo y médula. Los núcleos de los nervios craneales y vías sensitivas secundarias forman un caparazón externo que rodea a la FR tanto dorsal como lateralmente. En cambio, en la parte ventral, la FR está rodeada por el lemnisco medio y las vías motoras descendentes; lo cual facilita que muchos sistemas puedan proporcionarle información valiosa, constituyéndose en una base que puede modular una amplia variedad de funciones (**Lawrence et al., 1982**).

Hay desacuerdo con el sistema de fibras largas ascendentes y descendentes de la FR que emergen de los dos tercios mediales de esta estructura, mientras que el tercio lateral contiene neuronas que viajan sólo cortas distancias y sirven principalmente como neuronas intercalares. En relación con la organización de las fibras largas ascendentes y descendentes, son evidentes algunos principios de organización: (1) las ramas dendríticas principales de las neuronas se orientan en un plano perpendicular al eje longitudinal del tallo encefálico. Este hecho particular aumenta la probabilidad de que algunos sistemas de fibras ascendentes y descendentes de otras partes del SNC establezcan contactos sinápticos con estas neuronas; (2) muchas células de los dos tercios mediales de la FR dan origen a axones que se bifurcan y viajan largas distancias en ambas direcciones; (3) hay razones para creer que las neuronas que primero se proyectan en una corriente en

dirección arriba, están en posición ventral con respecto a las que se dirigen en dirección opuesta. Sin embargo, cada una de estas neuronas puede establecer contacto sináptico con la otra, en virtud de colaterales axónicas (**Lawrence et al., 1982**).

### **3.2 Funciones de la Formación Reticular**

Uno de los hechos notables de la FR es que no participa en una función, sino que interviene en una variedad de procesos. Éstos incluyen la modulación y transmisión de información sensitiva a centros superiores, la modulación de la actividad motora, el control de las respuestas autónomas, la regulación del ciclo sueño vigilia y del electroencefalograma (EEG) cortical, así como ser el sitio de origen de la mayoría, si no de todas, las monoaminas esparcidas por el SNC y de la mayor parte de los nervios craneales (**Lawrence et al., 1982**).

La mayor parte de la FR es excitadora, incluyendo especialmente la FR en las partes superiores y laterales del bulbo, en toda la protuberancia y el mesencéfalo.

El área facilitadora bulboreticular, y también los núcleos vestibulares, que realmente forman parte del sistema facilitador, son excitables intrínsecamente. Si no están inhibidos por señales procedentes de otras partes del sistema nervioso, tienen tendencia natural a transmitir impulsos nerviosos continuos hacia abajo, a las zonas motoras de la médula, y hacia arriba al cerebro anterior.

Una pequeña parte de la FR localizada en la región medioventral de los tres cuartos inferiores del bulbo ejerce funciones inhibitoras potentes, y se conoce como “área inhibidora bulboreticular”. La estimulación difusa de esta zona provoca disminución del tono en la mayor parte de músculos del cuerpo.

Un papel importante de la FR en la iniciación y mediación de crisis generalizadas ha sido propuesto con base en estudios con lesiones cerebrales, estimulación eléctrica y estudios de registro. Los efectos de drogas anticonvulsivas en neuronas de la FR con los modelos de PTZ, bicuculina y estriquina, han mostrado que causan alteración profunda en la respuesta neuronal de la FR a estímulos sensoriales (**Gerhard, 1987**).

Experimentos efectuados por **Sprague & Chambers (1954)**, demuestran que los efectos puramente excitatorios y puramente inhibitorios de la estimulación de la FR descritos por **Magoun & Rhines (1946)** son la excepción y no la regla. Más bien, el efecto es recíproco (inhibición extensora-contracción flexora y viceversa) en un miembro dado. La estimulación umbral próxima a la línea media (área inhibitoria de Magoun y Rhines) tiende a inhibir el tono extensor y ocasionar una contracción flexora. La estimulación lateral (del área facilitadora de Magoun y Rhines) tiende a facilitar la rigidez de descerebración y a inhibir la flexión. El sistema reticular inhibitorio extensor depende para su actividad de los impulsos descendentes de los centros superiores (corteza cerebral y cerebelosa). En cambio, las vías vestibuloespinales que facilitan los reflejos extensores, reciben impulsos de sistemas aferentes ascendentes, incluyendo aquellos que se originan en los músculos. Una sección mesencefálica eliminaría las aferencias del sistema reticular inhibitorio, dejando así al sistema facilitador sin oposición y determinaría la hiperactividad de los reflejos extensores (**Ruch et al., 1974**).

El efecto de la zona inhibidora bulboreticular constantemente es contrarrestado por el efecto excitador de la zona facilitadora bulboreticular. En consecuencia,

cuando las dos áreas están funcionando normalmente, las funciones motoras de la médula espinal ni están excitadas ni son inhibidas.

### 3.3 Vías de la Formación Reticular

La FR recibe su información aferente (**Tabla 1<sup>a</sup>**) de la médula espinal, cerebelo, hipotálamo, pallidum y corteza cerebral. Colaterales de fibras auditivas secundarias, del trigémino, y vestibulares, proporcionan también importantes ingresos (**Lawrence et al., 1982**). El ingreso sensorial en la FR tiene múltiples fuentes, incluyendo: (1) los haces espinoreticular y colateral procedentes de los haces espinotalámicos, (2) los haces vestibulares, (3) el cerebelo, (4) los ganglios basales, (5) la corteza cerebral, especialmente las regiones motoras, y (6) el hipotálamo y otras zonas vecinas asociadas (**Guyton, 1978**). Las fibras eferentes (**Tabla 1<sup>b</sup>**) de la FR se esparcen en la médula, cerebelo, hipotálamo y tálamo.

Considerando el acceso de una crisis generalizada **Peinfield & Jasper (1954)** propusieron la teoría centrocefálica de la epilepsia. Una de las principales vías subcorticales implicada en esta teoría es la FR del tallo cerebral que **Moruzzi & Mogoun (1949)** mostraron que juega un papel central en el control de la conciencia.

La corteza cerebral se propone importante en el proceso de crisis generalizadas. Algunas neuronas en la FR y corteza responden a los mismos estímulos. El análisis de correlación en registros simultáneos indica que las neuronas de la FR responden a estímulos de corta duración (**Faingold, Hoffman & Caspary, 1983<sup>a</sup>**).

**Tabla. 1ª. Vías aferentes de la Formación Reticular**

**I. Aferentes de :**

<b>A. Médula Espinal</b>
1. Fibras Espinoreticulares siguen los haces Espinotalámicos y terminan principalmente en el Bulbo y la Protuberancia.
<b>B. Cerebelo</b>
1. Desde los núcleos del techo las fibras pasan cruzadas y directas vía Fascículo Uncinado hasta terminar en el Bulbo y la Protuberancia.
<b>C. Núcleos de los nervios craneales-fibras secundarias desde:</b>
1. Sistema auditivo 2. Sistema visual 3. Sistema somatosensitivo
<b>D. Hipotálamo, por las siguientes vías que se dirigen principalmente al</b>
Encéfalo Medio y la Protuberancia: 1. Componentes descendentes del haz medial del Encéfalo Anterior 2. Pedúnculo Mamilar 3. Sistema Periventricular
<b>E. Corteza Cerebral</b>
1. Desde la Corteza Sensomotora vía fibras Corticoreticulares a las regiones de células grandes de la Protuberancia y del Bulbo
<b>F. Pallidum</b>
1. Del Segmento Palidal Medial las fibras se proyectan al Núcleo Pedunculoprotuberancial

(Lawrence et al., 1982).

## Tabla. 1<sup>b</sup>. Vías eferentes de la Formación Reticular

### II. Eferentes de :

<b>A. Médula Espinal</b>	
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Haz Reticuloespinal Lateral desde región de células grandes del Bulbo a todos los niveles de la Médula Espinal</li> <li>2. Haz Reticuloespinal Medial desde regiones de grandes células de la Protuberancia a todos los niveles de la Médula</li> </ol>
<b>B. Cerebelo</b>	
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lóbulos anterior y posterior desde:             <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Núcleo Lateral del Bulbo</li> <li>b. Núcleo Paramediano del Bulbo</li> <li>c. Núcleo Reticulotegmental de la Protuberancia</li> </ol> </li> </ol>
<b>C. Hipotálamo y Sistema Límbico</b>	
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Núcleo Mamilar Lateral desde el Núcleo Tegmental Profundo</li> <li>2. Hipotálamo Lateral, Núcleo Auditivo, Área Septal, Giro Singular Anterior y Formación del Hipocampo desde el Área Tegmental Ventral</li> <li>3. Hipotálamo Medial desde la Substancia Gris Periacueductal</li> </ol>
<b>D. Tálamo</b>	
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Núcleos Talámicos no específicos desde regiones diseminadas de la FR</li> </ol>
<b>E. Vías Monoamínicas</b>	
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vía Dopamínica desde el Área Tegmental Ventral vía haz medial del Encéfalo Anterior al Hipotálamo Lateral, Sistema Límbico y Corteza Prefrontal</li> <li>2. Vía Noradrenérgica desde algunos grupos celulares en la Protuberancia y el Bulbo al Hipotálamo, Sistema Límbico y Corteza Prefrontal</li> <li>3. Vía Serotoninérgica desde las neuronas del Rafé de la Protuberancia y el Encéfalo Medio a través del Hipotálamo Lateral a gran parte del Sistema Límbico y la Corteza Frontal</li> </ol>

(Lawrence et al., 1982).

La FR es el sitio de más antigüedad, este es considerado como un sitio de iniciación de crisis (**Faingold, 1987**).

En el caso de las epilepsias generalizadas de tipo gran mal, la FR del tallo cerebral ha sido identificada como la estructura que determina la eventual

generalización de una carga de origen cortical. La alteración de la regulación de la actividad cortical, función de la FR del tallo cerebral, permitiría la propagación de la actividad neuronal excesiva, independientemente de que ésta provenga de uno o varios focos epileptógenicos.

Por otra parte, **Bancaud et al. (1974)** demostraron que es posible producir descargas generalizadas, estimulando áreas corticales discretas, en este caso frontales. Finalmente **Gloor (1968)** ofrece la hipótesis que la zona cortical y centroencefálica son igualmente importantes en el mecanismo de producción de las ondas de despolarización generalizadas, y que esta descarga nace de la interacción anormal entre estos dos niveles del sistema nervioso (hipótesis corticoreticular).

El hecho de que lesiones en la FR mesencefálica y pontina pueden atenuar o en ocasiones bloquear las crisis en animales experimentales, proporciona un argumento a favor de la idea de que las estructuras subcorticales juegan un papel importante en la propagación de crisis generalizadas (**Browing et al., 1981; Jiannai et al., 1969; Kusske, 1972; Mirski & Ferrendelli, 1984; Van Straten, 1975; Woodruff, 1973**). Lesiones talámicas unilaterales decrecen la frecuencia de las crisis en algunos pacientes con epilepsia intratable (**Mullan, 1967**).

### **3.4 Drogas Antiepilépticas y Formación Reticular**

Algunos estudios establecen la importancia de la FR en la acción de drogas depresivas del SNC, sugiriendo la participación de estas estructuras en la epilepsia, muchas drogas anticonvulsivas también deprimen la conciencia. La pérdida de conciencia que ocurre durante una crisis generalizada también implica disminución de la función de la FR.



La FR está implicada en la iniciación y propagación de crisis producidas por drogas convulsivas, estímulos acústicos, kindling (en el que una estimulación eléctrica subconvulsiva repetida en alguna región del cerebro puede conducir al desarrollo de una crisis focal y generalizada), fotomioclonus (mioclonías provocadas por la influencia de la luz), modelos genéticos (cepas de animales con predisposición genética a desarrollar una crisis epiléptica) y ECH (**Faingold, 1987**).

El desarrollo de las crisis por kindling amigdalino presenta relaciones prominentes de la FR mesencefálica (**Wada, 1977**). Finalmente, parece ser que la FR es la mayor vía para la propagación de la actividad paroxística (convulsión, crisis o espasmo) a la médula espinal (**Gerhard, 1987**).

Inyecciones intracerebrales directas de algunas drogas anticonvulsivas en diferentes estructuras muestran que la sensibilidad del tallo cerebral es alta, y que la FR mesencefálica es más sensible al efecto del PTZ (**Jolly & Steinhaus, 1956; Tuttle & Richelson, 1969**). Inyecciones de penicilina en la FR dan como resultado espigas epileptiformes bilaterales en la corteza (**Ralston & Langer, 1965**). La inyección de cobalto en la FR da lugar a espigas y ondas complejas de alto voltaje y a crisis mioclónicas (**Cesa-Bianchi et al., 1967**). Microinyecciones de anticonvulsivos en la FR suprime crisis por ECH (**Gale & Iadarola, 1980**).

La FR ha mostrado gran sensibilidad a los depresores del SNC (**Skye et al., 1975; Shimoji et al., 1984**). Estas drogas son efectivas en el tratamiento de crisis tónico-clónicas (gran mal) y parciales (focal), y bloquean las vías que excitan la FR, en la cual, los agentes anticonvulsivos son efectivos ante crisis de ausencias (pequeño mal) y sólo bloquean las vías que inhiben a las neuronas del tallo cerebral. Las drogas anticonvulsivas son efectivas en crisis tónico-clónicas y de ausencias, y

bloquean ambas vías, excitadora e inhibidora (**Fromm, 1984, 1985, Fromm & Terrence, 1987**). Las drogas anticonvulsivas probablemente actúan en una mínima parte para prevenir la expansión de actividades paroxísticas anormales del foco epileptogénico y en neuronas circundantes (**Woodbury, 1969**). Por lo tanto, el hecho de que se necesiten drogas para deprimir las vías reticulares puede indicar que éstas representan una vía mayor para la propagación de crisis.

El incremento en la descarga neuronal de la FR producida por drogas convulsivas, puede ser revertido por administración de drogas anticonvulsivas (en especial la DFH y diazepam) (**Gerhard, 1987**).

Todas estas observaciones sugieren que la FR está involucrada en la propagación de la actividad de las crisis, y de que las drogas anticonvulsivas previenen las crisis en grados considerables por antagonistas en la propagación de la actividad paroxística vía FR (**Gerhard, 1987**).

El incremento de la respuesta neuronal en la FR puede también involucrar la acción de drogas convulsivas sobre receptores sensoriales, neuronas sensoriales primarias, o neuronas en otros sitios del cerebro, los cuales modulan la actividad de la FR. Por otro lado, la respuesta de neuronas de la FR por estimulación eléctrica en el primer núcleo regulador al sistema auditivo o visual son intensamente incrementadas después de la administración de algunos convulsivos (**Faingold, 1980, Faingold et al., 1983<sup>a</sup>**).

La administración convulsiva incrementa la respuesta evocada en la FR mesencefálica por estímulos eléctricos en los núcleos cocleares, complejo olivárico superior y lemnisco lateral, y sustancialmente reducen el incremento de la acción convulsiva de los potenciales evocados auditivos en la FR mesencefálica (**Faingold**

**et al., 1983<sup>b</sup>**). La magnitud de los efectos de las drogas convulsivas sobre vías sensoriales primarias es pequeña ante el mayor papel que juegan en el gran incremento de respuesta neuronal en la FR. La susceptibilidad de neuronas de la FR por el efecto de convulsivos, puede ser debido al extenso grado de plasticidad de respuestas sensoriales de estas neuronas (**Faingold , 1987**).

### **3.5 Estudios de Estimulación de la Formación Reticular**

Algunos estudios plantean que la estimulación de un sitio particular en la FR mesencefálica es capaz de causar convulsiones por estimulación interna durante períodos largos (**Chiu & Burnham, 1982; Burnham, 1985, 1987**). Las crisis severas son determinadas por la intensidad de los estímulos. La intensidad alta incrementa la intensidad del clonus y de los miembros posteriores. Las crisis duran más y pueden originarse desde la FR mesencefálica, pero no desde la porción más caudal de la FR (**Faingold, 1987**).

Estudios previos han reportado que la estimulación eléctrica de la FR, con intensidad relativamente elevada y larga duración, puede producir convulsiones con actividad epiléptica en la corteza de conejos, gatos y roedores (**Bergmann et al., 1963; Kreindler et al., 1958; Gioanni, 1991**).

Lesiones en la FR han mostrado disminución o bloqueo de las crisis generalizadas (**Browning, 1987**). Evidencias previas sugieren que grandes lesiones bilaterales en la FR mesencefálica en gatos bloquean la inducción de crisis por drogas convulsivas como el PTZ (**Freedman & Ferriss, 1956**). Pequeñas lesiones en la FR caudal mesencefálica y FR pontina incrementan el umbral a la crisis, y reducen crisis severas en gatos y roedores (**Jinnai et al., 1969; Browing et al.,**

**1981**). Lesiones en la FR mesencefálica disminuyen las crisis por kindling en la amígdala en gatos, y pueden atenuar las descargas provocadas por PTZ. En contraste, las convulsiones tónicas inducidas por ECH o estimulación audiogénica, no parecen ser afectadas por lesiones en la FR mesencefálica (**Gerhard, 1987**).

**Browning (1981)** reportó que lesiones mecánicas rostrales (en la mitad de la FR mesencefálica) fallaban para alterar los patrones del ECH en ratas.

## **4. LA SUBSTANCIA NIGRA**

### **4.1 Función de la Substancia Nigra (SN)**

La SN está implicada en la propagación de crisis producidas por drogas convulsivas, estímulos acústicos, kindling, fotomioclonus, ECH y lesiones cerebrales. El bloqueo del inicio, propagación o terminación de crisis generalizadas, puede estar involucrado entre otras cosas por: el tipo de inducción de la crisis, la intensidad de la iniciación del estímulo y por neuronas que participen en la descarga. La crisis puede proceder de vías con caminos alternos al bloqueo del sitio de acción en algunos circuitos del cerebro. Un papel importante de la SN probablemente sea sobre la propagación de crisis inducidas por ECH (**Faingold, 1987**).

Lesiones bilaterales de la SN ejercen efectos supresores sobre las crisis generalizadas (**Gale, 1986**). Se ha observado reducción de la inducción de crisis por electrochoque y por kindling en amígdala, en el umbral y en la severidad de la de crisis por medio de lesiones en la SN hechas eléctricamente (**Garant & Gale, 1983; Bonhaus et al., 1986**).

## 4.2 Vías de la Substancia Nigra

En relación a las conexiones aferentes de la SN, está bien establecido que el núcleo caudado y el putamen, proyectan topográficamente a la SN, de tal manera que las porciones mediales del caudado se proyectan a las partes mediales de la SN, mientras que las porciones laterales del caudado se proyectan a las partes laterales de la SN (**Beckstead et al., 1979; Duggal & Barasi, 1983; Schneider et al., 1985**). Sin embargo, la interacción funcional entre la FR y SN no son bien entendidas. No existe una vía directa entre médula espinal y colículos inferiores, pero la vía desde los colículos inferiores a la FR y colículos superiores ha sido reportada (**Brodal, 1981; Kudo et al., 1983**).

## 4.3 Drogas Antiepilépticas y Sustancia Nigra

El papel de la SN en convulsiones generalizadas ha sido estudiado por **Iadarola y Gale (1982)**, estos autores han mostrado que el incremento selectivo en el contenido del GABA (ácido gammaaminobutírico, aminoácido con actividad de neurotransmisor presente en el cerebro, corazón, pulmones, riñones y ciertas plantas) en la SN por microinyecciones de  $\gamma$ -vinyl-GABA (inhibidor GABA-t irreversible) bloquea la extensión de los miembros posteriores por ECH. El curso temporal de esta protección para la extensión de los miembros posteriores coincide exactamente con la elevación y declinación en el contenido de GABA en la SN. En contraste, inyecciones de  $\gamma$ -vinyl-GABA en sitios fuera de la SN como el tallo cerebral caudal fallan para producir protección a las crisis por ECH. **Garant y Gale (1983)** observaron que las lesiones eléctricas bilaterales (pero no unilaterales) en la

SN abolían la extensión tónica de los miembros posteriores en la prueba del ECH y atenuaban las convulsiones inducidas por bicuculina.

Se ha encontrado que microinyecciones de  $\gamma$ -vinyl-GABA o muscimol en el tallo cerebral de ratas bloquea las crisis tónico-clónicas producidas por ECH, o por drogas convulsivantes (**Gale & Iadarola, 1980; Iadarola & Gale, 1982**). Estas investigaciones sugieren que la SN es el sitio crítico del mesencéfalo en la actividad anticonvulsivante mediada por GABA y que son necesarias inyecciones bilaterales para obtener protección a las crisis. Similarmente, inyecciones bilaterales intranigrales de GABA o muscimol disminuyen las crisis por kindling amigdalino y decrementan la duración de las postdescargas eléctricas (**McNamara, 1983; Le Gal La Salle, 1983**). El hecho de que el umbral a la crisis se incrementa por la aplicación intranigral de agonistas GABAérgicos, no indica que los patrones espaciales y temporales de las convulsiones sean cambiados, así se sugiere que la SN funciona como un regulador de la propagación de las crisis (**Gale, 1985**). La SN parece ser el área clave para la propagación de las crisis y por lo tanto para la acción de las drogas anticonvulsivas (**Marrosu, 1990**). Hay evidencias de que el efecto intranigral de agonistas del GABA depende de los modelos de crisis utilizados, así como de los componentes de las crisis (**Depaulis et al., 1989, 1990; Miller & Ferrendelli, 1990; Zhang, 1991**).

Las descargas neuronales en la SN reticulata, generalmente son aumentadas por la administración sistémica de drogas convulsivantes (**Waszczak et al., 1980, 1981**). En trabajos recientes, se ha podido demostrar que en el tallo cerebral existen sitios críticos para la regulación de la excitabilidad en la corteza cerebral. Así, la aplicación localizada de muscimol, agonista GABAérgico, a nivel de la SN, es capaz

de inhibir las convulsiones inducidas por ECH o por la inyección de diferentes agentes convulsivos. Al parecer, la inhibición de las eferencias nigrales de la pars reticulata al tálamo, tectum y FR modulan la propagación de la actividad paroxística (Gerhard, 1987).

## 5. EPILEPSIA EXPERIMENTAL

### 5.1 Características Generales de los Modelos de Epilepsia Experimental

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha definido a la epilepsia como una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes, que se deben a una descarga neuronal excesiva (crisis epilépticas), que se asocian a diversas manifestaciones clínicas. Existen diferentes modelos de epilepsia en animales de laboratorio que abarcan una gran cantidad de tipos de crisis, todos ellos con una gran importancia para la determinación de la efectividad de los diferentes medicamentos para controlar cada tipo de crisis, tal como se muestra en la **Tabla 2**.

Tradicionalmente, los modelos experimentales de epilepsia, tanto los de crisis generalizadas como los de crisis focales han sido la base para la experimentación farmacológica de nuevos medicamentos antiepilépticos (Löscher & Schmidt, 2002). Las bases de estos modelos experimentales se han apoyado en las características clínicas de las diversas variedades de crisis epilépticas que en la actualidad están bien definidas en la clasificación de la Liga Internacional Contra la Epilepsia.

La variedad clínica de cada crisis epiléptica ha tratado de ser reproducida en el caso de las crisis generalizadas, con los modelos de electrochoque (ECH) y kindling, por estimulación química con Pentilentetrazol (PTZ) y bicuculina o con modelos de cepas mutantes (Peterson & Albertson, 1998; Rogawski, 2006). Así

también, para el estudio de las crisis focales, los modelos más usados de generación de crisis epilépticas han sido los de penicilina o alúmina en la corteza cerebral en animales experimentales (**Löscher & Schmidt, 1988; Löscher et al., 1991<sup>a</sup>, 1991<sup>b</sup>; Löscher & Björn, 1991; Fisher, 1989**).

## **5.2 Objetivos de los Modelos Epilépticos**

El paso más importante en el descubrimiento de una nueva droga antiepiléptica es la selección del modelo experimental para la propagación inicial de la actividad anticonvulsivante (**Kupfelberg, 1989; Löscher, 1991<sup>c</sup>; Martín & Pozo, 2006**). Los modelos experimentales que son más usados para la investigación en epilepsia son el ECH y PTZ (**Krall et al., 1978; Löscher, 1985; Purpura, 1972; Swinyard, 1969; Peterson & Albertson, 1998; Rogawski, 2006**).

El ECH es utilizado como modelo para CTCG y la inducción de crisis clónicas por la administración subcutánea (s.c.) de PTZ se utiliza como modelo de crisis generalizada del pequeño mal (**Krall et al., 1978; Swinyard, 1969; Löscher et al., 1991<sup>b</sup>; Fisher, 1989**). Los diferentes modelos de epilepsia en animales son usados en la búsqueda de nuevos anticonvulsivos, en los cuales las drogas antiepilépticas tradicionales son activas (**Löscher & Schmidt, 1988; Peterson & Albertson, 1998**). La DFH esta estructuralmente relacionada al fenobarbital y es usada cuando las benzodiazepinas fallan (**Martín & Pozo, 2006**).



**Tabla 2. Modelos de epilepsia experimental en animales.**

<p>Parcial Simple, Aguda.</p> <p>Convulsivantes Tópicos:                      Penicilina                      Bicuculina                      Picrotoxina                      Estricnina                      Colinérgicos</p> <p>Otros.</p> <p>Estimulación Eléctrica Aguda:                      Rebanadas de neocorteza cerebral</p>	<p>Otros.</p> <p>Alteraciones Metabólicas:                      Hipoxia                      Hipoglicemia                      Uremia                      Altas temperaturas</p>
<p>Parcial Simple, Crónica.</p> <p>Implantaciones metálicas Corticales:                      Hidróxido de aluminio                      Cobalto                      Zinc                      Hierro</p>	<p>Parcial Compleja.                      Ácido Kaínico                      Toxinas tetánicas                      Kindling</p>
<p>Daño Criogénico.</p>	<p>Rebanadas Cerebrales:                      Rebanadas de hipocampo de roedor                      Preparaciones celulares</p>
<p>Tónico-Clónico Generalizadas.</p>	<p>Ausencias Generalizadas.</p> <p>Estimulación talámica                      Foco cortical bilateral                      Penicilina sistémica</p>
<p>Genéticas:                      Babuínos fotosensibles                      Crisis audiogénicas en ratón                      Ratas genéticamente propensas                      Rata del desierto (Gerbo)</p>	<p>Estatus Epiléptico.</p> <p>Estimulación recurrente</p>
	<p>Electrochoque Máximo.</p> <p>Convulsivantes Químicos:                      Pentilentetrazol                      Picrotoxina                      Bicuculina                      Penicilina</p>

Fisher, 1989.

Para seleccionar un modelo experimental de epilepsia deben considerarse:

1.- Especie. Algunos tipos de crisis son más comunes en algunas especies de animales, como la epilepsia fotogénica (**Naquet & Meldrum, 1972**) o audiogénicas (**Collins, 1972**), que son peculiares en ciertas especies.

2.- Edad. El estado de desarrollo del cerebro juega un papel importante en la activación convulsiva del SNC (**Purpura, 1972**).

3.- Tipo de crisis. Las características clínicas de la epilepsia pueden depender del sitio o sitios de excitación. Usualmente las convulsiones motoras focales son iniciadas por una excitación que involucra a la corteza motora. Se ha encontrado que algunas crisis del pequeño mal se originan desde la corteza promotora o prefrontal (**Marcus, 1972**). Manifestaciones psicomotoras producidas por irritaciones medio temporales (**Mayanagi & Walker, 1974**), se caracterizan por presentar mirada fija, movimiento de los ojos, automatismo, vocalización, masticación y otras respuestas motoras.

4.- Tiempo de acceso de la epilepsia. Dependiendo del agente epiléptico, las crisis pueden ocurrir inmediatamente después de la estimulación o demorar minutos o hasta meses (**Walker, 1983**).

5.- Crisis espontáneas o inducidas. Las crisis experimentales pueden ser inducidas por alguna condición o pueden ocurrir espontáneamente.

6.- Crisis simples o recurrentes. Para algunos estudios las crisis simples son recurrentes, pero a menudo las crisis recurrentes son anuladas. Las crisis subsecuentes pueden ser reproducidas por otras aplicaciones de excitación, o en algunos modelos, puede ocurrir espontáneamente a intervalos, o ser estimulados

por una dosis subconvulsiva de un agente epiléptico cuando es requerida otra crisis (**Prince, 1972**).

7.- Causa-efecto. En algunas preparaciones, la causa-efecto del agente se relaciona al fenómeno convulsivo. En la hipoglicemia por ejemplo, la fisiología y otros disturbios autónomos bajo manifestaciones epilépticas pueden ser prominentes.

8.- Sustrato patológico. Cambios patológicos en el cerebro pueden presentarse como el resultado de la aplicación de agentes epileptogénicos o por la propia crisis.

Clínicamente se ha podido estimar que un 20% de los pacientes con epilepsia no pueden ser tratados exitosamente con las drogas antiepilépticas actuales (**Schmidt & Morselli, 1986**). Para poder controlar a este tipo de pacientes es necesario desarrollar modelos experimentales de epilepsia, que simulen las características presentadas en pacientes con epilepsia no controlable, y el efecto de nuevos anticonvulsivantes en estos modelos. Los modelos de ECH y PTZ son básicos para el estudio de nuevos fármacos anticonvulsivos, siendo utilizados en la mayoría de los laboratorios de investigación epiléptica en todo el mundo, considerando a los modelos epilépticos como base importante para el estudio de los fármacos antiepilépticos (**Gladding & Kupfeberg, 1985; Peterson & Albertson, 1998**). La prueba del ECH tiene la finalidad de predecir la efectividad de la droga en crisis generalizadas de tipo tónico-clónico (gran mal), mientras que la prueba de PTZ es utilizada para evaluar la efectividad de las drogas en crisis generalizadas del pequeño mal o ausencias (**Woodbury, 1972; Löscher & Schmidt, 1988; Fisher, 1989; Peterson & Albertson, 1998; Rogawski, 2006**).

Aunque los modelos de ECH y PTZ han sido muy utilizados para el estudio y desarrollo del conocimiento de nuevas drogas antiepilépticas, existen diferentes modelos que simulan otros tipos de epilepsia y que pueden ser adicionados a los modelos tradicionales durante la evaluación de la droga (**Löscher & Schmidt, 1988**).

La búsqueda experimental de las drogas antiepilépticas ha sido realizada en ratas y ratones, donde las crisis han sido inducidas por medios químicos o eléctricos. Estos modelos (ECH y PTZ) en roedores han sido usados para la identificación de drogas con acción anticonvulsiva, es obvio que no se llega a englobar el desarrollo epiléptico en humanos, pero la representación de los modelos para la inducción de crisis epilépticas simples solo abarcan ciertas circunstancias en relación a la epilepsia clínica en humanos (**Fisher, 1989**).

Según **Löscher & Schmidt (1988)**, un modelo ideal de epilepsia debe presentar las siguientes características: (1) el desarrollo de crisis recurrentes espontáneas; (2) un tipo de crisis similar a la fenomenología clínica de la crisis en epilepsia humana; (3) que el tiempo de la crisis epiléptica sea similar al de los síndromes epilépticos generalizados en humanos; (4) las crisis clínicas tienen que estar asociadas con actividades parecidas a la epilepsia en el EEG. Actualmente, ningún modelo ha presentado todos estos criterios, sin embargo muchos son utilizados debido a que presentan algunas de las características mencionadas, permitiendo el estudio de los fármacos antiepilépticos con cierta particularidad, pudiendo entender más a fondo el comportamiento de la droga al integrar la información colectada al probar el fármaco ante diversos modelos de epilepsia.

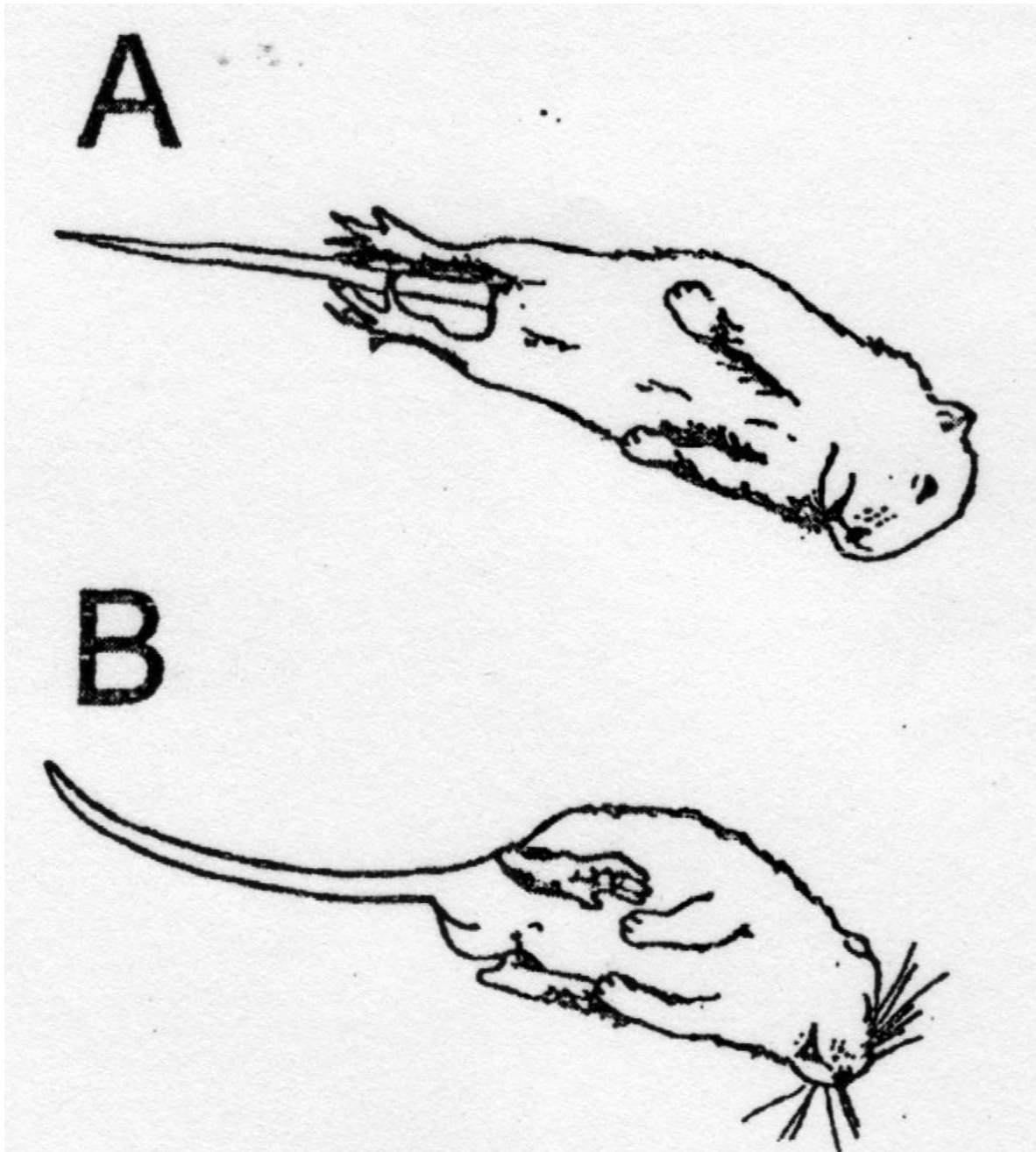
### 5.3 Modelos Eléctricos

Tres de los mejores tipos de modelos de inducción de crisis eléctricas pueden ser diferenciados: (1) modelos de umbral, en él se puede definir la corriente (voltaje) necesaria para provocar una crisis mínima (clónica) o máxima (extensión tónica); (2) la prueba del ECH con estimulación supramáxima; y (3) estimulación eléctrica focal con el modelo de kindling, en el que una estimulación eléctrica subconvulsiva repetida en alguna región del cerebro puede conducir el desarrollo de una crisis focal y generalizada (**Chambon et al.,1986; Marsan, 1972; Swinyard, 1972; Löscher et al., 1991<sup>a</sup>; Peterson & Albertson, 1998**). Modelos en los que se usa una estimulación eléctrica focal con la inducción de estímulos convulsivos después de las descargas provee un método simple para la reproducción del fenómeno ictal (manifestaciones que el paciente puede experimentar varios días antes de las crisis como la alteración del humor, irritabilidad, ansiedad, cansancio, somnolencia, etc.) de una epilepsia parcial (**Marsan, 1972**), pero comparándolo con el kindling, posee la desventaja de que el progreso epileptogénico no se pueda estudiar.

El electrochoque (ECH) es quizá el mejor estudiado y el modelo más usado para generar crisis. Desde 1870 se han usado los estímulos eléctricos para producir crisis en animales (**Fritsch, 1972**). **Spiegel (1937)** cuantificó la técnica para producir crisis por choques eléctricos en el cráneo de animales. **Merrit & Putnam (1938b)** aplicaron el ECH proyectándolo a series de derivados barbiturados, resultando en el desarrollo de la DFH. El ECH es una prueba que permite la evaluación de una sustancia para prevenir la difusión de una crisis a través del tejido neuronal (**Löscher et al., 1991**). En la prueba del ECH, los

animales usualmente ratones o ratas, reciben un estímulo de suficiente cantidad para inducir una crisis máxima (extensión tónica) de los miembros posteriores (**Fig. 2**). Por tal razón, se necesita de más investigación acerca de la corriente de potencial supramáximo (50 mA en ratón y 150 mA en rata).

El umbral a la crisis por ECH predice la efectividad de las drogas en crisis generalizadas del tipo gran mal y es mucho más sensitiva en este respecto que la inducción supraumbral del ECH. La estimulación eléctrica es aplicada vía electrodos corneales o auditivos, con un estimulador que libera una corriente a una frecuencia de voltaje constante de 50-60/s con una duración del estímulo de 0.5 s y una intensidad de 50 mA. Un punto importante es la resistencia interna del estimulador, que puede ser localizado en consideración a la resistencia externa del animal (alrededor de 5 Kohms). El umbral es usualmente determinado hasta que la corriente o voltaje inducen la extensión de los miembros posteriores en el 50% de los animales (**Löscher et al., 1991**). El criterio para la ocurrencia de la crisis máxima es la extensión tónica de los miembros posteriores (**Swinyard et al., 1952; Raines & Anderson, 1976**). En las ratas, la extensión de los miembros posteriores no puede ser inducida confiablemente por estimulación eléctrica, y la extensión de estos miembros puede ser usada como punto final (**Fisher, 1989; Peterson & Albertson, 1998**). La respuesta convulsiva de las ratas al ECH (150 mA, 0.2 s, 60 Hz) a través de electrodos corneales, comienza por una fase tónica (flexión tónica seguida de la extensión de los miembros posteriores). La fase tónica es seguida por un clonus bilateral de los miembros posteriores.



**Fig. 2.** Extensión tónica en el ratón. Representado en la letra A el animal muestra una extensión tónica de las extremidades posteriores. Ésta es la respuesta mas severa al electrochoque y puede durar hasta 15 segundos. El animal mostrado en la letra B muestra una extensión tónica sin la extensión de los miembros posteriores. La abolición de de la extensión tónica es una indicación de la actividad del fármaco antiepiléptico en crisis tónico-clónico generalizadas. La inhibición de la crisis inducida se considera si las extremidades no se extienden en un ángulo mayor a 90° con respecto al torso (**Peterson & Albertson, 1998**).

La prueba del ECH ha sido utilizada para evaluar la potencialidad efectiva de las drogas frente a la CTCG. En esta prueba, la habilidad de la droga para abolir la extensión de los miembros posteriores es un índice de la efectividad anticonvulsiva (**Gerhard, 1987**). Para realizar el ECH se aplica una gota de solución salina a cada ojo del animal, posteriormente se colocan los electrodos (cornéales o auriculares), seguidos por un estímulo eléctrico de 50 mA para ratón o 150 mA para rata, con una frecuencia de 60 Hz por un tiempo de 0.2 s, posteriormente se realiza la observación en el transcurso de la crisis, que consiste en la flexión y extensión tónica de los miembros posteriores de 0.2-0.5 s, después de la convulsión clónica generalizada sigue una recuperación del animal (**Stagnitto, 1990; Peterson & Albertson, 1998**) como se muestra en la **Fig. 2**. El componente tónico se considera abolido si la extensión de los miembros posteriores no excede 90° en ángulo con el plano del cuerpo (**Porter et al., 1984; Swinyard & Woodehad, 1982**).

La corriente convulsiva en el 50% de los animales (CC 50) o voltaje convulsivo en el 50% de los animales (VC 50), también designado como VE 50 puede ser determinado por los efectos de las curvas de corriente correspondientes a cada dosis, determinado en la curva de efecto (**Litchfield & Wilcoxon, 1949**), usando de 8-10 animales por intensidad de estímulo. Se necesita menos tiempo y cantidad de animales para la determinación del umbral por los métodos llamados súperos o íferos. El VE 50 y los límites de confianza para el 95% de probabilidad puede ser calculado matemáticamente por las respuestas positivas (crisis tónica) y negativas (sin crisis tónica) obtenidas con el grupo de animales. Para comparar los efectos de la droga, se ha sugerido calcular la dosis para elevar el umbral en un



20% de los animales que se utilizaron (**Swinyard et al., 1952, Löscher, 1982**). Las dosis respectivas para cada droga se presentan en la **Tabla 3**. El umbral control en el ratón es aproximadamente de 6-9 mA o de 90-140 V respectivamente, dependiendo de la tensión, edad y método de estimulación (umbrales determinados vía electrodos auditivos, la cual es un poco menor que la determinada vía electrodos corneales). Si los animales son utilizados mas de una vez, el aumento postictal en el umbral de la crisis debe ser considerado. Si la determinación no es más de una vez al día, el umbral de la crisis es marcadamente constante (**Fisher, 1989**).

**Tabla 3. Potencia anticonvulsivante de algunas drogas comunes.**

DROGA	DOSIS EFECTIVA PARA INCREMENTAR EL UMBRAL A LA CRISIS EN RATÓN (mg/kg)		NEUROTOXICIDAD ANTIEPILÉPTICA (mg/kg i. p.)	
	ECH i. p.	PTZ i. v.	Ratón	Rata
DFH	006.0	NE	065.0	130.0
Carbamecepina	-----	NE	072.0	026.0
Fenobarbital	001.5	004.0	069.0	024.0
Primidona	002.5	-----	680.0	300.0
Acido Valproico	110.0	100.0	425.0	365.0
Etosuximida	NE	160.0	440.0	220.0
Diazepam	003.5	000.5	007.3	002.4

NE= No Efectivo, i. p.= intraperitoneal, i. v.= intravenoso.

**Löscher & Schmidt, 1988**

Todos los animales son estimulados con la misma intensidad de corriente supramáxima (corriente necesaria para generar un potencial de acción nerviosa). Con una corriente constante de 50 mA (50-60 s) puede ser usado para el ratón y una corriente de 150 mA para la rata (**Swinyard, 1972., Swinyard, 1949.,**

**Swinyard et al., 1952**). Con un estimulador de voltaje constante, el voltaje mínimo puede ser de 250 V para el ratón y 750 V para la rata (el umbral máximo para las crisis en ratas es aproximadamente de 250-350 V ó 20-50 mA). Cuando es necesario, la extensión de los miembros puede ser considerado como un punto final alternativo. El estímulo es aplicado vía electrodos corneales o auditivos por 0.2 s, pero debido a la resistencia del estimulador éste se puede ver elevado. La potencia anticonvulsiva de la droga en la prueba del ECH se determina por el cálculo de la anticonvulsión para la supresión de la extensión tónica de los miembros posteriores (DE 50). Grupos de 8-10 animales se usan por cada dosis y la DE 50 se calcula por la curva de efectividad de la dosis por el método descrito por **Litchfield & Wilcoxon (1949)**.

Los márgenes entre las dosis con actividad anticonvulsiva son expresados por los Índices de Protección (IP). Para obtener el IP de pruebas de un compuesto, los efectos adversos y los efectos anticonvulsivantes son cuantificados en pruebas situadas por el análisis cuántico de dosis-respuesta (la correspondencia entre la cantidad de droga y la magnitud del efecto), usando algunos grupos de animales. Para obtener las curvas dosis-respuesta, la Dosis Neurotóxica Media Mínima o dosis necesaria mínima para generar neurotoxicidad en el 50% de la población (TD 50) y la DE 50, es calculada dividiendo TD 50/DE 50 (**Löscher & Björn, 1991**).

A través del ECH, PTZ y las pruebas de neurotoxicidad que se han utilizado para la identificación de anticonvulsivos, estas pruebas han cuantificado durante las últimas décadas, y los resultados que se han reportado sobre las drogas antiepilépticas comunes y del desarrollo de nuevos anticonvulsivos en estas

pruebas aparentemente estandarizadas muestran variaciones cuantitativa y cualitativamente (**Chweh et al., 1985; Frey, 1985; Krall et al., 1978; Löscher, 1985, Löscher & Schmidt, 1988; Worms & Lloyd, 1981**), sugiriendo que los factores técnicos, biológicos, farmacológicos y otros como el modelo experimental, especies y vía de administración afectan los resultados experimentales obtenidos. Varios estudios han determinado la importancia de mantener constantes algunos factores como especie, sexo, edad, temperatura del ambiente, dieta, ritmo circadiano, ritmos hormonales y estacionales en la evaluación de las drogas antiepilépticas (**Koella, 1985; Maynert, 1969; Pórszász & Wórum, 1971; Swinyard, 1969, Woodbury, 1969; Woodbury & Davenport, 1952**).

Aunque algunos modelos de crisis usan una estimulación eléctrica para la inducción de CTCG en roedores, y son ampliamente empleadas para identificar anticonvulsivos, la importancia del papel de las diferentes técnicas, los factores biológicos y los farmacológicos en la interpretación de los resultados que se obtienen con estos modelos muchas veces no es reconocida (**Peterson & Albertson, 1998; Löscher, et al. 1991<sup>a</sup>**).

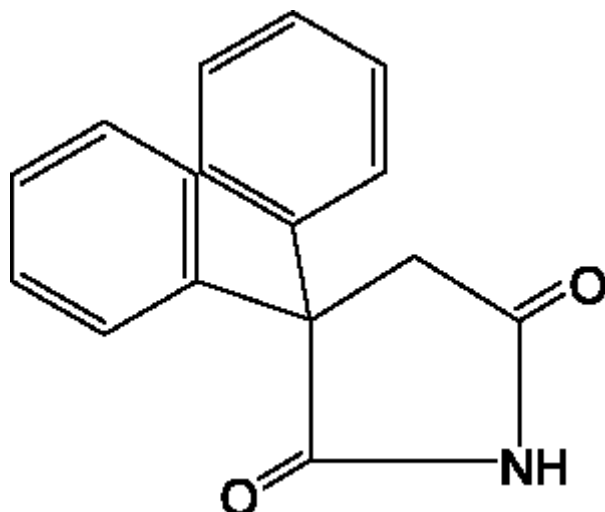
## **6 LA DIFENILHIDANTOINA COMO ANTIEPILÉPTICO**

### **6.1 Historia de la Difenilhidantoína**

Se sabe que los primeros medicamentos antiepilépticos utilizados en la clínica no fueron estudiados en función de su eficacia, de su toxicidad, o su seguridad porque cuando se introdujeron a la terapia humana se carecía de instituciones que reglamentaran la experimentación clínica en relación a la seguridad y eficacia.

En el tratamiento farmacológico de la epilepsia, el objetivo es disminuir la frecuencia de las crisis, la gravedad de las mismas y reducir la toxicidad para el cerebro y otros tejidos. Los antiepilépticos son generalmente administrados por vía oral e intravenosa, limitando su acceso y permanencia al cerebro por la barrera hematoencefálica y haciendo que los medicamentos antiepilépticos no sean siempre eficaces (**Bennewitz & Saltzman, 2009**).

La DFH (**Fig. 3**) significó un gran avance en la terapia médica para el control de la epilepsia porque su uso es el resultado de una investigación planeada. Blitz la sintetizó por primera vez en 1908, sin embargo, cuando se llegó a probar como un hipnótico se encontró que era poco potente. Para entonces, Merritt y Putnam ya habían estudiado e introducido el modelo del ECH para identificar compuestos con probable efecto anticonvulsivo, fue así como en 1938 estos investigadores pudieron demostrar la eficacia anticonvulsivante que tiene la DFH. Este hallazgo fue de gran relevancia porque, además de encontrar que este fármaco era efectivo contra varios tipos de epilepsia, éste no presentaba efectos sedantes, dejando en claro que el estudio con ECH podría ser una herramienta valiosa para el estudio de la neurofisiología de la epilepsia por medio de diferentes tipos de animales experimentales, poniendo así en evidencia la posibilidad de que se pudieran valorar experimentalmente la eficacia de todos los medicamentos anticonvulsivos por medio de diferentes especies de animales experimentales (**Martínez, 1991; Meldrum & Rogawski, 2007**).



**Fig. 3.** Estructura química de la difenilhidantoína (Research Biochemicals Incorporated, 1991).

Por otra parte, se ha documentado que desde 1938 la DFH ha sido uno de los fármacos anticonvulsivos usado con mayor frecuencia para el tratamiento de los diferentes tipos de crisis epilépticas como las crisis generalizadas (gran mal) y de crisis parciales, ésto por la eficacia mostrada para el control de este tipo de crisis en humanos (Marrosu, 1990).

Recientemente, la DFH ha sido reevaluada como antiepiléptico por diferentes investigadores, llegando así a ser determinada como un fármaco prototipo para inhibir las convulsiones experimentales inducidas por ECH (Martínez, 1991). Así también, se ha llegado a documentar que la DFH llega a ser altamente efectiva para inhibir las crisis experimentales ocasionadas por ECH, sin embargo ésta llega a ser poco efectiva para poder controlar las crisis producidas por PTZ (Löscher & Schmidt, 1988, Löscher et al., 1991<sup>a</sup>, Löscher et al., 1991<sup>b</sup>; Fisher, 1989).

A pesar del interés substancial en el desarrollo de fármacos antiepilépticos (FAE) más seguros y eficaces, seis clases de FAE en uso desde hace 15 a 75 años siguen siendo los fármacos primarios usados para tratar pacientes con epilepsia. Las diferentes clases de FAE incluyen a la DFH, carbamazepina, barbitúricos, valproato y benzodiacepinas. Estos FAE son utilizados para tratar CTCG, mioclonías, ausencias y crisis parciales. El uso de diferentes clases de FAE se debe a que su eficacia es variable contra los diferentes tipos de crisis epilépticas. La DFH y la carbamazepina se emplean preferentemente en casos de CTCG y parciales (**Macdonald, 1991**). Recientemente el tratamiento con drogas antiepilépticas ha presentado avances notables, con la introducción de 11 nuevos FAE de segunda generación como son: valproato, vigabatrina, tiagabina, lamotrigina, oxcarbacepina, felbamato, topiramida, gabapentina, levetiracetam, zonisamida y pregabalina (**Rogawski, 2006; Meldrum & Rogawski, 2007**).

Los estudios experimentales de estimulación han estandarizado los métodos para la evaluación de las drogas anticonvulsivantes (**Woodbury, 1972**). En los años treinta la DFH, la mesantoína y los diones fueron introducidos (**Walker, 1983**).

La DFH es esencialmente la única hidantoína usada clínicamente en el presente, y ha sido empleada para probar diferentes modelos de crisis epilépticas en animales. Merritt y Putnam (**Merritt, 1938<sup>a</sup>**) identificaron a la DFH como una droga anticonvulsiva con acciones sedativas e hipnóticas leves. Además, la DFH es efectiva ante crisis tónico-clónica generalizada y en todos los tipos de crisis parciales (**Eadie & Tyrer, 1980; Macdonald, 1986**).

## 6.2 Farmacología de la Difenilhidantoína

El uso apropiado de las drogas para el tratamiento de la epilepsia se basa principalmente en: la absorción, distribución y eliminación de la droga (**Porter, 1983**). La cantidad que se absorbe de los anticonvulsivos desde los diferentes tipos de administración (oral, subcutánea o intramuscular) dependen de diferentes factores como: el pKa y la solubilidad de la droga en los lípidos, el pH de los medios en los que las drogas son disueltas, así como el lugar de ingreso de la misma y su concentración. Muchos anticonvulsivos son absorbidos desde el tracto gastrointestinal por difusión pasiva de iones a través de la mucosa y dentro del torrente sanguíneo. La DFH presenta un pKa de 9.2, así la DFH es extremadamente insoluble en los jugos gástricos a un pH bajo, por lo que la velocidad de absorción en el estomago resulta consecuentemente baja.

La porción distal del duodeno es el sitio de máxima reabsorción después de la administración oral, donde el pH es de 7-8 permitiendo que alguna cantidad de DFH disuelta se absorba (**Woodbury, 1969**). Una porción de la droga está limitada al unirse a las proteínas del plasma, las cuales sirven como reservorio de mantenimiento de la droga que se encuentra libre, prolongando así la acción del fármaco. La unión de la DFH al plasma varía entre las diferentes especies de animales, excepto en el ratón, en el cual la cantidad de la droga libre es elevada, únicamente 1/20 del total de la concentración de la DFH en el plasma está en estado libre (**Woodbury, 1969**).

Comparando la administración intraperitoneal (i.p.) con la administración intravenosa (i.v.) de DFH, las concentraciones séricas aumentan y decaen

rápidamente después de la administración i. v. obteniendo así que la vía i. p. es más eficiente que la i. v. (**Lothman, 1991**).

Otro punto importante es el pH de los fluidos extracelulares e intracelulares, la distribución del fármaco entre los fluidos extra e intracelulares es dependiente del gradiente de pH a través de los fluidos y del pKa de las drogas.

La distribución de la DFH, la cual tiene un pKa de 9.2, no sigue la razón calculada de la ecuación de Henderson-Hasselbach (la cuál es empleada para medir la transferencia de un fármaco desde su sitio de administración hacia la sangre). Así, algunos cambios en el pH extracelular y/o intracelular, tienen un pequeño efecto sobre los calculados porque el pKa es alto y el pH de la droga existe predominantemente no ionizada. Los cambios de pH ejercen importantes efectos sobre la distribución de los fármacos anticonvulsivantes a través de la membrana celular, no únicamente por cambios de la ionización de las drogas, sino también por la alteración de la unión al plasma o constituyentes de los tejidos. Los cambios de pH afectan la cantidad de fármaco utilizable en los sitios del receptor (**Woodbury, 1969**).

La farmacocinética de la DFH parece ser la misma en adultos mayores que en jóvenes, no hubo diferencias entre mujeres y hombres en cuanto al volumen de distribución y la vida media de eliminación (**Ahn et al, 2008**).

Para tener acceso al receptor, la administración oral del medicamento debe pasar la barrera de la mucosa gástrica y el tracto gastrointestinal, introducirse a la circulación, difundirse al espacio extracelular y atravesar la barrera de la membrana celular, si el sitio del receptor se encuentra en la célula. Varios factores afectan estos procesos (absorción del fármaco, distribución en el cuerpo, acción



en los receptores y la subsecuente eliminación por biotransformación y excreción) son importantes en algunos estudios que prueban la valoración de los anticonvulsivantes (**Woodbury, 1969**).

**Firemark et al. (1963)** especuló que la DFH se une a las proteínas del cerebro. Otro factor importante en la evaluación de las drogas anticonvulsivantes es el papel del líquido cerebroespinal (LCE) en la regulación de la concentración del anticonvulsivante en el SNC. El LCE en el ventrículo y cavidad subaracnoidea, desde la coroides a la villi aracnoides provee un continuo drenaje de sustancias que entran a la vía cerebral. Además, las sustancias que entran al LCE desde el cerebro por vía villi aracnoides, sustancias como aniones monovalentes, probablemente potasio y algunos electrolitos, entran a la sangre por transporte activo a través de las células coroides (**Woodbury, 1969**).

La administración de DFH en adultos es de 5-7 mg/kg diarios para alcanzar concentraciones séricas terapéuticas de 10-20 µg/ml (**Macdonald, 1986**). Sin embargo, dado que la DFH se liga aproximadamente al 90% de las proteínas, la concentración de DFH libre en el serum y en el fluido cerebroespinal es solamente de 1-2 µg/ml (**Sironi, 1980**).

Las propiedades fisicoquímicas como el momento molecular dipolo y el coeficiente de partición han sido asociados con la actividad anticonvulsiva de la DFH debido a que ésta debe tener la habilidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) (**Woodbury, 1982**). Debido a que en esta estructura se restringe la entrada de compuestos polares y grandes moléculas como proteínas, aparentemente las drogas anticonvulsivas como la DFH pueden estar limitadas para atravesar la BHE por la fuerte unión a las proteínas plasmáticas. Realmente,

las concentraciones de DFH cerebrales en rata han sido solo el 12.5% de la que se encuentra en el serum (**Cornford, 1984**). Este índice de medida cerebral y medidas en vivo de transferencia a través de la BHE, representa la fracción de DFH en el cerebro que es aproximadamente 1/3 a 6/10 de las concentraciones totales en el plasma de la droga en estado libre. Así, la fracción libre de DFH que hay en el plasma penetra en la BHE uniéndose a varios constituyentes celulares. De esta concentración de DFH se pueden lograr niveles en el cerebro muy similares a los niveles plasmáticos, puesto que las uniones de las macromoléculas son más fuertes que las de las proteínas plasmáticas (**Firemark, Barlow & Roth, 1963**). También, la lipofilia de la DFH es un factor importante para su acumulación en el SNC por medio de los fosfolípidos y proteínas (**Goldberg & Todoroff, 1976**). Este mecanismo de entrada al SNC, el cual es controlado por la afinidad molecular puede restringir la distribución de la DFH en el cerebro, el cual puede ser alterado por diferentes estados de la enfermedad. **Rapport et al. (1975)** encontró diferencias en la concentración de DFH entre un cerebro normal y el foco epiléptico, de este hallazgo se ha especulado que la DFH no podría penetrar fácilmente en el foco epiléptico debido a la reducción del fluido sanguíneo o a la disminución de la afinidad en el foco epiléptico comparado con el tejido normal. Esto puede explicar la pobre respuesta que a veces se observa.

La DFH no se distribuye homogéneamente en el cerebro, sino que se acumula en el cerebro y en el tallo cerebral (**Kokenge, 1965**). Algunas de las indicaciones de toxicidad de la DFH descritas clínicamente y en pruebas histológicas revelan la degeneración de las células de Purkinje producidas por la

DFH en el humano y en animales de laboratorio (**Snider & Del Cerro, 1972; Anderson & Raines, 1974**).

**Puro & Woodward (1973)** encontraron que el período de descargas espontáneas de las células de Purkinje son deprimidas por dosis elevadas de DFH. La DFH se distribuye rápidamente en algunos tejidos y se puede concentrar más en éstos que en el plasma. En el cerebro, grasa y músculo esquelético la droga se encuentra a menor concentración que en hígado, riñón y glándulas salivales. La DFH en el hígado se puede metabolizar en tres diferentes productos y es rápidamente excretada en la bilis dentro del tracto gastrointestinal. Únicamente algunos restos del fármaco penetran el tracto gastrointestinal provenientes de la bilis, solamente el 6% ingresa por vía salival y probablemente también por medio del páncreas (**Woodbury, 1969**). Algunos minutos después, la DFH y sus metabolitos se excretan en las heces fecales después de que el medicamento es administrado intravenosamente. Por otra parte, cuando la droga se administra oralmente, aproximadamente el 10% de la DFH se excreta por esta vía. El hígado es capaz de metabolizar a la DFH y otros tejidos acumulan la droga secundariamente. Eventualmente, todos los metabolitos se absorben desde el tracto gastrointestinal, los cuales son excretados posteriormente. A las 24 horas el 50% de los metabolitos están presentes en el tracto gastrointestinal y otro 50% están en la orina; a las 48 horas el 93% se ha excretado por la orina. Únicamente el 5% de la dosis administrada no se excreta por la orina (**Woodbury, 1969**).

La DFH induce la síntesis de monoxigenasas hepáticas y enzimas conjugadas. Ésto puede dar como resultado una aceleración en el metabolismo de otros medicamentos liposolubles, llevando a una disminución de los efectos

farmacológicos. Las interacciones farmacodinámicas pueden causar problemas en pacientes epilépticos (**Brodie, 1992**). Las interacciones farmacocinéticas pueden afectar la absorción, distribución, metabolismo y excreción de la droga debido a la marcada variabilidad interindividual en estos eventos. Sólo un pequeño porcentaje de pacientes puede sufrir repercusiones clínicas importantes (**Brodie, 1992**).

Muchas interacciones inhibitorias involucran enzimas monooxigenasas hepáticas, usualmente como consecuencia de la competencia entre el índice y la interacción del fármaco en los sitios de unión de la enzima concerniente. La interacción farmacodinámica puede ser inferida por la producción de sinergismo o antagonismo para los efectos benéficos o adversos de dos medicamentos con o sin evidencia de cambios en la concentración de alguna de éstas (**McInnes & Brodie, 1988**). El resultado de la interacción puede afectar al sistema biológico, órgano, célula o enzima.

Todas las drogas antiepilépticas producen deterioro cognitivo. Ésto puede ser potenciado por otros agentes psicoactivos como el etanol y antihistamínicos (**Brodie, 1988**). Además, algunos agentes neurolepticos y antidepresivos tricíclicos tienen un potencial para reducir el umbral a la crisis, y exacerbaban el desorden clínico (**Wroblensky et al., 1990**).

La absorción, distribución, biotransformación y excreción de las drogas determina la concentración del fármaco disponible para el receptor y la duración del efecto. Estos cambios en cualquiera de los parámetros antes mencionados puede modificar sustancialmente la evaluación cuantitativa de las drogas. Así, la determinación de estos parámetros puede incrementar el entendimiento del mecanismo por el cual actúa el fármaco anticonvulsivo. La toxicidad depende de la

concentración de la droga, particularmente en pacientes que reciben DFH se presenta debido a que el metabolismo hepático es saturable y finalmente de lleva una autoinducción en la cantidad de enzimas capaces de metabolizar el fármaco (**Woodbury, 1969**). La mayoría de la biotransformación de los fármacos anticonvulsivantes tiene lugar en el hígado por la enzima metabolizadora de drogas localizada en el endoplasma reticular o microsomas (**Cuccinelli et al., 1965; Hansen et al., 1966; Kiorboe, 1966**).

### **6.3 Efectos Adversos**

Los efectos adversos de los medicamentos antiepilépticos pueden ser divididos en: (a) efectos tóxicos; (b) efectos en órganos específicos; (c) efectos potenciados como resultado de interacciones con otros fármacos; (d) efectos teratogénicos.

Las relaciones adversas de las drogas fueron reportadas por **Rawlins (1982)**. El clasificó las reacciones de los medicamentos en dos tipos: Tipo A, en donde los efectos adversos del fármaco pueden ser explicados por las propiedades farmacológicas del mismo; Tipo B, siendo estos efectos adversos inexplicables.

Las reacciones Tipo A son resultado del aumento de los efectos farmacológicos, y se presenta en el límite de la curva dosis-respuesta (representación cuantitativa que expresa el efecto biológico en función de la concentración de un fármaco). Éstas también pueden ser por el resultado de la formulación farmacéutica o de factores farmacocinéticos individuales como la

absorción o la excreción del fármaco (**Dreifuss, 1983**). Las reacciones Tipo A específicas se presentan en la **Tabla 4**.

La DFH puede reducir los niveles de tiroxina libres en la sangre, otros efectos endocrinos incluyen la elevación de los niveles de cortisol en el plasma por la DFH (**Choy, 1971; Gallagher, 1976; Meikle, 1969; Vincent, 1978**). La DFH puede interferir con el metabolismo de los carbohidratos, esto incrementa la dificultad en el control de la diabetes (**Cudsworth & Cunningham, 1974; Janz & Schmidt, 1975; Schmidt, 1981**).

La DFH está implicada con algunos efectos metabólicos como son la osteomalacia (trastorno del hueso laminar, caracterizado por la pérdida de la calcificación de la matriz, dando lugar a reblandecimiento del hueso, que se acompaña de debilidad, fracturas, dolor, anorexia y pérdida de peso) con reducción sérica de la 25-hidrocoleciferol (**Bell et al., 1979; Kruse, 1968; Latorre & Kenny, 1974; Mosekilde & Melsen, 1976; Rowe, 1974**). Los niveles de calcio algunas veces disminuyen y se elevan los de fosfatasas alcalinas. Los cambios en los huesos son notorios por los efectos de la desmineralización. Además, la DFH está implicada con el desarrollo de la anemia megaloblástica (**Druskin, 1962; Kiorboe & Plum, 1966**) y de la encefalopatía con cambios mentales.

La similitud del anillo hidantoínico de la DFH con el anillo imidazólico de la cimetidina puede aumentar la posibilidad de que actúe similarmente para inhibir el sistema citocromo P-450 involucrado en el catabolismo oxidativo del estradiol, resultando en la elevación de los niveles séricos de estradiol (**Galbraith & Michanovicz, 1989**).

Por otra parte se ha sugerido que la DFH puede reducir la testosterona libre mediante la inducción de aromatasa, que incrementa la conversión de la testosterona libre a estradiol. El estradiol ejerce una fuerte influencia inhibidora sobre la secreción de hormona luteinizante y también se ha sugerido que juega un papel importante en la retroalimentación negativa, tanto en hombres como en mujeres (**Herzog, 1991**). Se ha llegado a determinar en diferentes estudios que la DFH está implicada fuertemente con la reducción de IgA en el serum y en la saliva (**Aarli, 1976, 1980; Fontana, 1976**).

**Tabla 4. Tipos específicos de reacciones Tipo A.**

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Difenilhidantohína.               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Agudas: Somnolencia, ataxia, diplopía, complicaciones gastrointestinales, náuseas, hipotensión.</li> <li>○ Crónicas: Hiperplasia gingival, anemia megaloblástica, osteomalacia con deficiencia de vitamina D, encefalopatía, disfunción cerebral, disfunción endocrina, pseudolinfoma, inmunosupresión, agranulocitosis, hemorragia en recién nacidos.</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fenobarbital.               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Agudas: Sedación, disturbios de la conducta, ataxia.</li> <li>○ Crónicas: Dificultad para concentrarse, deficiencia cognitiva, pérdida de la iniciativa, hemorragia en recién nacidos.</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primidona.               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Agudas: Sedación, vértigo, náuseas, inestabilidad.</li> <li>○ Crónicas: Disturbios en la conducta, dificultad para concentrarse, pérdida de la libido, hemorragia en recién nacidos.</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carbamazepina.               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Agudas: Diplopía, somnolencia, vértigo, estomatitis, problemas de secreción, diarrea, deshidratación, constipación.</li> <li>○ Crónicas: Inducción enzimática, anemia, leucopenia, elevación enzimática hepática.</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Benzodiacepinas.               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Agudas: Sedación, ataxia, irritabilidad, crisis tónicas.</li> <li>○ Crónicas: Disturbios conductuales, pérdida de iniciativa.</li> </ul> </li> </ul>

Dreifuss, 1983.

Algunos estudios implican a la DFH como un factor que puede incrementar el daño en las funciones cognitivas de los individuos (**Nolte, 1980; Stores, 1975**). Además se ha reportado en pacientes que toman DFH un síndrome de deterioro intelectual progresivo que no siempre es reversible. (**Vallarta, 1974**).

En cuanto a la parte de los efectos neurológicos que se pueden relacionar con la dosis administrada de DFH éstos son muy conocidos y han sido muy estudiados, los más frecuentemente reportados son: temblor, vértigo, diplopía (doble visión), nistagmo (movimientos rítmicos involuntarios de los ojos), ataxia (marcha inestable y desequilibrio postural), disartria (dificultad para hablar), y cambios mentales (**Schmidt, 1982; Schmidt & Lempert, 1987**). De acuerdo con algunos estudios, se ha reportado que el nistagmo puede aparecer cuando la concentración de DFH en el plasma es alrededor de 20µg/ml, la ataxia y los cambios mentales de 30 y 40 µg/ml respectivamente (**Buchtal & Lennox-Buchtal, 1972**).

Hasta ahora, las dosis anticonvulsivas de varios fármacos pueden producir sedación, daños a la actividad motora y otros defectos en funciones centrales. Con respecto a la DFH, ésta es poco neurotóxica en ratas y en el ratón. La DFH (50-200 mg/Kg) induce sedación, ataxia y un incremento en el tono muscular; algunos animales exhiben crisis clónicas a estas altas dosis de DFH (**Löscher & Björn, 1991**).

También se ha descrito el desarrollo de movimientos anormales con la administración de DFH (**Ahmed et al., 1975; Chadwick & Reynolds, 1976; Chalhub, 1976; Rasmussen & Kristensen, 1977**). El síndrome de coreoatetosis (movimientos involuntarios irregulares que pueden afectar a la cara, cuello, tronco,



extremidades o a los músculos respiratorios, dando la apariencia de intranquilidad) se puede presentar en pacientes que toman DFH (**Bodensteiner, 1981; Lauting, 1979**). Algunos pacientes que toman DFH por largos períodos pueden presentar evidencias de neuritis periférica (inflamación o degeneración diseminada, aguda o subaguda de nervios periféricos de distribución simétrica, caracterizada inicialmente por acorchamiento y hormigueo de las extremidades, sensación de calor, frío y fiebre ligera que progresa a dolor) por ausencia del reflejo rotuliano y por el retraso de la velocidad de conducción nerviosa. Esta neuropatía es generalmente asintomática.

Las reacciones Tipo B aparentemente no están relacionadas con los fármacos, o con acciones farmacológicas. El salpullido en la piel abarca las erupciones morbiliformes, o dermatitis exfoliativa. Ésto se puede presentar con cualquier medicamento anticonvulsivo (**Pollack, 1979; Roberts & Marks, 1981; Weedon, 1975**). Se pueden presentar anomalías más específicas como el eritema multiforme (infiltrados linfocíticos en la piel, que causan necrosis de los queratinocitos), síndrome de Stevens-Johnson (enfermedad inflamatoria grave, en ocasiones mortal. Se caracteriza por la aparición aguda de fiebre, ampollas en la piel y úlceras en las mucosas de labios, ojos, boca, vías nasales y genitales) (**Mueller, 1963; Pollack, 1979; Taafe & O'Brien, 1975**), epidermolisis necrozante (grupo de enfermedades cutáneas hereditarias poco frecuentes en las que se desarrollan vesículas y ampollas, especialmente en zonas traumatizadas) (**Gately & Lam, 1979**) o esclerodermia (endurecimiento y engrosamiento crónico de la piel causado por la acumulación de colágeno) (**Teoh & Chan, 1975**).

El Lupus eritematoso sistémico se ha descrito por la administración de DFH (**Boernink & Miller, 1973; Bourlond, 1970**). El lupus eritematoso consiste en fiebre, artritis (inflamación de las articulaciones que se caracteriza por dolor y tumefacción), linfadenopatía (cualquier proceso que ocasiona un crecimiento localizado o generalizado de los ganglios o vasos linfáticos) y ocasionalmente miocarditis (trastorno inflamatorio del miocardio producido por una infección viral, bacteriana o micótica, enfermedad del suero, fiebre reumática por un agente químico o como complicación de una enfermedad del colágeno), pericarditis (inflamación del pericardio asociada a traumatismos, neoplasias, infecciones, uremia, infarto de miocardio, enfermedades del colágeno u otras causas desconocidas) y fallas renales (**Agarwal et al., 1977**).

Las discrasias sanguíneas (trastorno en el que cualquiera de los constituyentes de la sangre es anormal o está presente en una cantidad anormal, como ocurre en la leucemia y en la hemofilia) son los efectos colaterales más serios que se presentan en terapias con medicamentos anticonvulsivantes. El daño puede ser en las líneas de células maduras, en el caso de que sólo se encuentre un elemento involucrado, el resultado es la trombocitopenia (trastorno sanguíneo en el que el número de plaquetas está disminuido) y la agranulocitopenia (trastorno sanguíneo caracterizado por una reducción grave del número de granulocitos), pero en la mayoría de los casos severos se presenta hipoplasia de la médula ósea.

La depresión en la médula ósea puede dar como resultado efectos alérgicos o tóxicos. La mortandad por anemia aplásica (deficiencia de todos los elementos formes de la sangre como consecuencia de una insuficiencia medular

que no es capaz de generar nuevas células) después de la administración de fármacos antiepilépticos es del 75% aproximadamente.

La DFH puede conducir a la linfadenopatía que forma parte de un síndrome en donde se presenta fiebre, salpullido, hepatosplenomegalia (aumento de tamaño del bazo y del hígado) (**Chaiken, 1950; Gropper, 1956**).

La toxicidad hepática es una reacción adversa (del Tipo B) con una mortalidad muy elevada, ésta puede complicar la terapia con DFH que usualmente parte de una enfermedad febril con la hepatosplenomegalia (**Andreasen et al., 1973; Bourlond, 1970; Gropper, 1956; Lee, 1976**).

#### **6.4 Mecanismos de Acción de la Difenilhidantoína**

Para estudiar los mecanismos de acción de las drogas antiepilépticas es esencial recurrir a modelos experimentales de crisis (in vivo y/o In vitro) sobre el cual probar los fármacos antiepilépticos (**Woodbury, 1983**).

No obstante, para conocer la actividad de la droga, es importante identificar el sitio de acción (receptor) en el sistema nervioso central (SNC) para el caso de los anticonvulsivos. Para que estos fármacos lleguen al receptor en el SNC deben pasar un número de barreras físicas y ganar acceso al receptor, dependiendo de las propiedades físicas y químicas de la droga. Cuando el medicamento alcanza al receptor, la duración de acción depende de procesos físicos y químicos, para la inactivación de la droga y/o la eliminación de ésta desde el receptor y eventualmente del cuerpo. Ésto es esencialmente importante para evaluar las drogas anticonvulsivas y para definir los factores farmacológicos concernientes al ingreso y egreso de los fármacos a los receptores, así como la duración de acción

en el receptor. Además, el efecto de la droga en su sitio de acción está condicionado por una variedad de procesos fisiológicos que pueden incrementar o disminuir la susceptibilidad del sitio del receptor a la acción del fármaco (**Woodbury, 1969; Bennewitz & Saltzman, 2009**).

Así, a concentraciones séricas de 10-20 µg/ml (40-80 µM) de DFH, ésta ejerce una acción anticonvulsivante pudiendo causar sedación o interferir con la función normal en algunos sujetos (**Jones, 1985; Rall, 1980**), además de algunos efectos cognoscitivos que han sido reportados (**Thompson, 1981**).

No obstante de su gran uso, el mecanismo de acción anticonvulsivo de la DFH se basa en las siguientes hipótesis: estabilización de la membrana hiperexcitada (**Koery, 1951; Rosenberg, 1967; Toman, 1949**), bloqueo de la conductancia de sodio (**Lipicky, 1972; Pincus, 1972; Martín & Pozo, 2006**), supresión de la transmisión sináptica excitadora vía presinápsis o postsinápsis (**Gage, 1980; Yaari, 1985, Martín & Pozo, 2006**), y el incremento de la inhibición mediada por GABA (**Aickin, 1981**).

La DFH parece tener múltiples acciones (**Woodbury, 1980**), incluyendo: (a) acciones no sinápticas para reducir la conducción de sodio bloqueando los disparos repetitivos y reduciendo la potenciación posttetánica, (b) acciones postsinápticas para inducir la inhibición mediada por GABA y reducir la transmisión sináptica excitadora, (c) acciones presinápticas para reducir la entrada de calcio y bloquear la liberación de neurotransmisores (**Macdonald, 1986**).

Las acciones no sinápticas o directas sobre la membrana abarcan: (a) reducción del período máximo de despolarización del potencial de acción (**Hershkowitz & Ayala, 1981**), (b) reducción de la entrada de sodio (**Courtney &**

**Etter, 1983; Matsuki, 1981, Martín & Pozo, 2006**), (c) limitación de los disparos repetitivos de los potenciales de acción dependientes de sodio (**McLean & McDonald, 1981; Perry, 1978**).

En cultivos neuronales de médula espinal se observa que no se restringe el potencial de membrana, ni la resistencia interna se altera significativamente por la DFH a concentraciones de 2-50  $\mu\text{g/ml}$  (**McLean & McDonald, 1983**), la DFH a 2  $\mu\text{g/ml}$  no altera la acción los potenciales dependientes de sodio, pero a concentraciones mayores el período de elevación del potencial de acción se reduce alrededor del 50% con la correspondiente reducción del potencial de acción. En contraste, la DFH altera los ciclos de disparos repetitivos de los potenciales de acción a concentraciones menores de 2  $\mu\text{g/ml}$  (**Macdonald, 1986**). El mecanismo de la DFH para bloquear los disparos repetitivos todavía no está claro.

Estudios con fijación de voltaje (**Courtney & Etter, 1983; Matsuki, 1981**), han sugerido que la DFH se liga reversiblemente a los canales de sodio (de manera dependiente del voltaje y tiempo), inactivando la acción de iniciación del potencial de acción para producir una limitación dependiente de la frecuencia. Con el disparo de cada potencial de acción sucesivo en el tren, más canales podrían agregarse en un estado de inactivación, hasta que el resto de los canales sean insuficientes y posteriormente se liberen de la DFH para responder a futuras excitaciones (**Macdonald, 1986**).

Postsinápticamente la DFH se ha mostrado como un reductor de las respuestas excitadoras en neuronas de la corteza e hipocampo de rata (**Matthews & Connor, 1977**). Presinápticamente, la DFH (2.5-25  $\mu\text{g/ml}$ ) se presenta como un

bloqueador de la liberación de neurotransmisores en la unión neuromuscular de anfibios y ratones (**Gage, 1980**), y de la liberación de potasio por la 3H-norepinefrina en cultivos de tejidos cerebrales de rata (**Pincus & Lee, 1973**). Este bloqueo puede ser efectuado por la reducción de la influencia de calcio. Además, la DFH decreta la amplitud de los potenciales dependientes de calcio en neuroblastomas de ratón (**Tuttle & Richelson, 1979**), reduciendo las concentraciones de nucleótidos cíclicos en sinaptosomas (**DeLorenzo, 1976**).

La DFH disminuye la descarga repetitiva sostenida a concentraciones séricas terapéuticas, y además reduce la amplitud de los potenciales de acción dependientes de sodio al aumentar la dependencia de voltaje de la inactivación del estado estable y reducir el ritmo de recuperación de la inactivación de los canales sódicos (**Macdonald, 1991; Rogawski, 2006**).

La DFH reduce el flujo de calcio en las terminales sinápticas, y bloquea la liberación presináptica del neurotransmisor (**Yaari, 1985, Martín & Pozo, 2006**).

Las investigaciones realizadas por **Macdonald (1991)** muestran que la DFH suprime el potencial de acción sódico, pero sólo bajo condiciones en las que se presentan disparos repetitivos. Probablemente ésto puede ser debido a que la droga hiperpolariza la membrana estimulando la bomba de sodio-potasio o por incrementar la conductancia de varios iones. Alternativamente, la DFH puede reducir la corriente entrante de sodio por interacción con los canales dependientes del voltaje. Ésto puede acompañarse por la inactivación de los canales sódicos, inhibiendo la activación del canal o reduciendo el flujo de corriente por medio de la apertura de los canales.

Hasta el momento, los mecanismos por los cuales la DFH puede interferir con las corrientes de calcio todavía no están bien esclarecidos. Se ha llegado a plantear la existencia de un mecanismo alternativo para la inducción del bloqueo del canal de calcio por la DFH, pudiendo ser éste, la inhibición de la fosforilación del mismo canal (**Macdonald, 1991; Martín & Pozo, 2006**).

La búsqueda del papel de la ATPasa sodio-potasio en la epilepsia se ha centrado en encontrar defectos en el transporte que puede involucrar una clara reducción de la liberación de potasio extracelular por la despolarización neural vía mecanismos pasivos o la reducción del transporte activo mediado por la ATPasa sodio-potasio en las neuronas o en la glía (**Stahl & Harris, 1986**). Es posible que el defecto de la ATPasa sodio-potasio pueda modificar el nivel de excitabilidad de las células por la afección del transporte de calcio o la liberación del neurotransmisor por los mecanismos descritos por **Vizi (1978)** y **Powis (1981)**.

**Tower (1969)** propuso que el defecto del transporte de sodio y potasio puede contribuir a los disparos espontáneos repetitivos, basado en el decremento de la habilidad de tejidos cerebrales de humanos epilépticos para acumular el potasio.

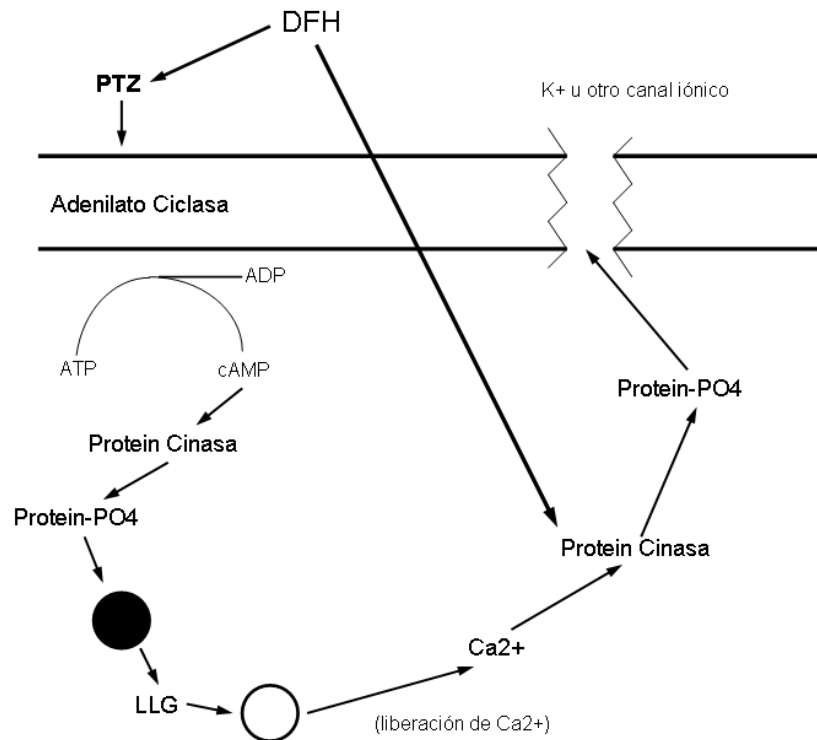
**Woodbury (1955)** encontró una correlación directa entre la tasa de concentración de sodio extracelular/intracelular y el umbral del ECH en ratas. La DFH incrementa el flujo de sodio en ratas normales y decrementa la concentración sódica intracelular en ratas normales y en ratas expuestas a ECH. De esta manera, la actividad anticrisis de la DFH resulta de la estimulación de la bomba de sodio, disminuyendo el sodio intracelular.

**Perry (1978)** encontró que en el axón de calamar la DFH como la tetrodoxina, restringe el bloqueo y la excitabilidad de los canales de sodio. Esto sugiere que la DFH y la tetrodoxina pueden tener estructura análogas y que la DFH puede ejercer este efecto por la inhibición específica de la permeabilidad sódica. **Catterall (1981)** encontró que la DFH bloquea la activación del canal de sodio por un mecanismo alostérico competitivo. Se ha planteado que la DFH y la carbamazepina comparten parte del mismo mecanismo de acción bloqueando los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (**Armijo et al., 2005; Katarzyna et al., 2005**).

Estudios de **Goldberg (1977)** muestran evidencia de la unión de la DFH a los fosfolípidos membranales, postulando que las interacciones pueden tener mayor influencia en la estabilización de la membrana; tal vez, por asociación de calcio con las membranas. **Sugaya (1987)** sugiere que la inhibición de calcio intracelular acontece en gran parte por acción de la DFH (**Fig. 4**).

Algunas de las observaciones de los efectos de la DFH en el SNC es que suprime el incremento de la amplitud de las descargas reflejas que normalmente son seguidas de estimulaciones a altas frecuencias por medio de vías aferentes (**Esplin, 1957**). En contraste, la descarga refleja no es afectada a períodos cortos de estimulación. En algunos momentos se ha propuesto que la DFH bloquea la potenciación postetánica (producción de potenciales posinápticos aumentados en respuesta a la estimulación, ocurre después de un breve tren de estímulos en la neurona presináptica) de la transmisión sináptica (**Yaari, 1986**).





**Fig. 4.** Esquema del probable modelo de acción de la difenilhidantoína.

(Sugaya, 1987).

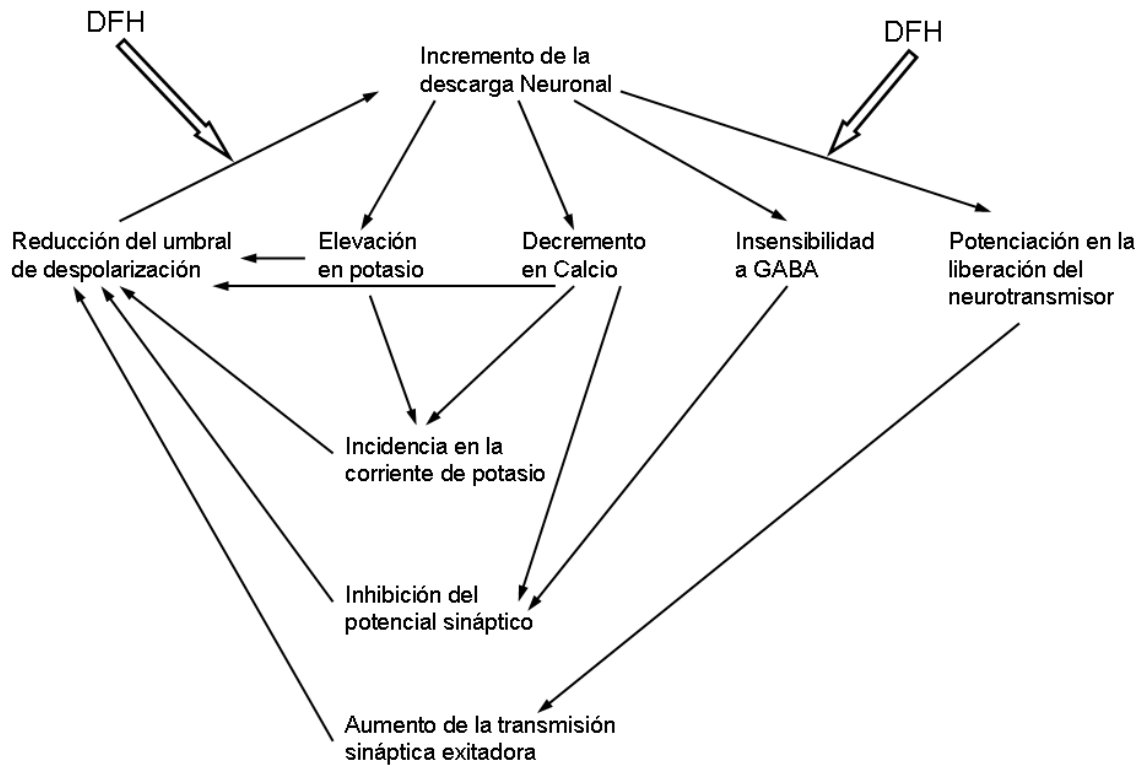
Los neurotransmisores son liberados sobre las terminales presinápticas por exocitosis de vesículas sinápticas, éste procedimiento está mediado por los receptores de calcio (**Katz, 1969**). La DFH induce la reducción de la liberación del neurotransmisor por el bloqueo de calcio en las terminales presinápticas.

Se ha sugerido que la DFH puede interferir con la liberación de neurotransmisores por la inhibición de la fosforilación protéica membranal estimulada por calcio, pudiendo disminuir la exocitosis de las vesículas sinápticas (**DeLorenzo, 1976**). La DFH puede afectar la transmisión sináptica por la interacción directa con los receptores postsinápticos.

En algunos estudios evaluados con sinapsis excitadoras, se encontró que la DFH (50-100  $\mu$ M) deprime la acción postsináptica del neurotransmisor acetilcolina (**Gage, 1980; Yaari, 1977, 1979**). También hay evidencias de que la DFH puede aumentar la acción postsináptica inhibitoria del GABA.

El GABA es el mayor transmisor inhibitorio en el SNC de los mamíferos, sus disfunciones han sido frecuentemente implicadas en la fisiopatología de la crisis (**Olsen, 1984**). El mecanismo más común del GABA es la acción inhibitoria postsináptica, creando una hiperpolarización neuronal a través de la activación de los canales de cloro en la membrana (**Coombs, 1955**). El receptor a GABA y el canal de cloro residen en una proteína compleja de la membrana postsináptica que parece poseer sitios modulares de receptores para benzodiazepinas y barbitúricos (**Olsen, 1984**). La DFH puede interactuar en este complejo en el sitio del receptor benzodiazepínico (**Olsen, 1981**), incrementando el tiempo de apertura de los canales de cloro, aumentando y prolongando la corriente inhibitoria postsináptica (**Aickin, 1981**). Un esquema que extrapola los efectos de la DFH basado en la realización de mamíferos epilépticos se presenta en la **Fig. 5**.

Por otro lado, se ha señalado la hipótesis de que la DFH interfiere con la transmisión dopaminérgica (**Lalonde, 1985; Lepore, 1985; Marrosu, 1990**).



**Fig. 5.** Modelo simplificado de la retroalimentación positiva bajo el desarrollo de una crisis máxima y la posible influencia de la difenilhidantoína sobre esta.

(Yaari, 1986).

## OBJETIVOS

Los propósitos del presente estudio fueron:

1. Determinar los posibles sitios de acción para controlar crisis epilépticas generalizadas inducidas por electrochoque en el ratón de la DFH administrada intracerebralmente en el tallo cerebral.
2. Obtener el grado de potencia de la DFH en los posibles sitios de acción, ante crisis epilépticas generalizadas producidas con el modelo de ECH en el ratón.

## **METODOLOGIA**

### **a) Técnica de Microinyección**

Se utilizaron 167 ratones machos de la cepa NIH con un peso de 25-35 g, los cuales se ambientaron a un período de luz-obscuridad de 12/12 horas respectivamente, durante dos meses previos a la experimentación. Los animales se albergaron en cajas de policarbonato especiales para ratón, con agua y comida ad libitum.

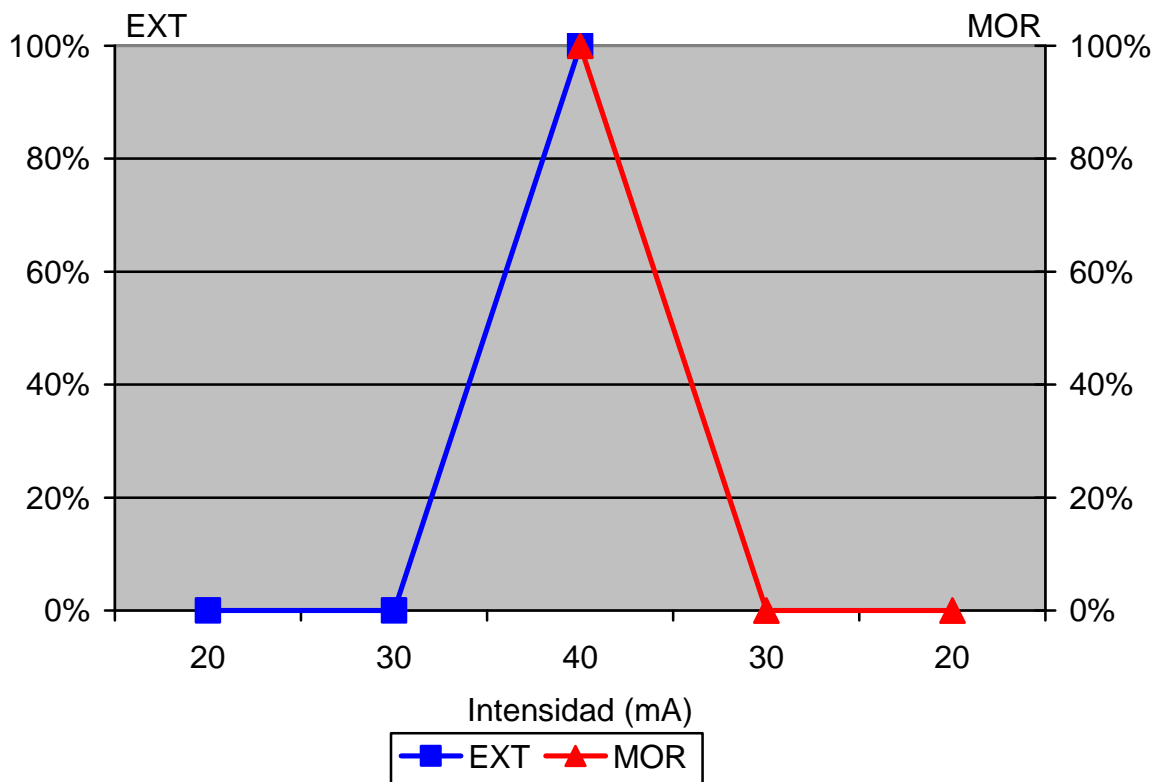
Los ratones fueron divididos en tres grupos. Al primer grupo con 20 solamente se le suministró un ECH, sin una microinyección intracerebral previa. Este primer grupo fue utilizado para determinar el umbral convulsivo producido por ECH. Al segundo grupo con 68 ratones se le suministró 0.5µl de solución salina al 0.9% por medio de una cánula de microinyección intracerebral calibre 27 de 5 mm de longitud conectada a una micro jeringa Hamilton de 10µl. 20 minutos después de la microinyección intracerebral a cada animal experimental se le aplicó un ECH y se valoró la crisis epiléptica producida. Al tercer grupo con 79 ratones se le suministró 25µg/0.5µl de DFH por medio de una cánula de microinyección intracerebral calibre 27 de 5 mm de longitud conectada a una micro jeringa Hamilton de 10µl. 20 minutos después de la microinyección intracerebral se le aplicó un ECH a cada animal experimental y se valoró la crisis epiléptica producida.

### **b) Inducción por Electrochoque de Crisis Tónico-clónico Generalizadas**

En el primer grupo se realizaron pruebas para determinar el umbral convulsivo producido por ECH vía corneal, para lo cual, se diseñaron electrodos

corneales con características específicas para la córnea del ratón. En esta técnica, los electrodos se conectaron a un electro estimulador con las siguientes especificaciones, una corriente eléctrica de 20, 30 ó 40 mA, con pulsos cuadrados de 60 Hz, con 0.25 seg de duración del estímulo. Para determinar el porcentaje de EXT y MOR como se muestra en la **Gráfica 1**, se utilizaron 20 ratones machos de la cepa NIH (5 con una intensidad de 20 mA, 5 con una intensidad de 30 mA y 10 con una intensidad de 40 mA).

Para realizar el ECH, se aplicó una gota de solución salina a cada ojo del animal, posteriormente se colocaron los electrodos corneales previamente cubiertos con crema conductora, seguido a la colocación de los electrodos se les administró un estímulo eléctrico de 20, 30 ó 40 mA a ciclos cuadrados de 60 Hz durante 0.25 seg. Posteriormente, se realizó la observación de la crisis que consiste de una flexión y extensión tónica de los miembros posteriores dentro de la convulsión clónica generalizada seguida por depresión y recuperación, o en su caso, la muerte del animal. El componente tónico se consideró abolido si la extensión de los miembros posteriores no excedía los 90° en ángulo con el plano del cuerpo.



**Gráfica 1.** Curva intensidad-respuesta que muestra el umbral convulsivo a la EXT y MOR inducido por ECH en el ratón de la cepa NIH (25-35 g) con una duración de el impulso eléctrico de 0.25 s. Esta gráfica permite determinar el umbral convulsivo de 40 mA que será utilizado para los grupos tratados con solución salina y DFH.

### c) Tratamiento Histológico

Se fijaron los animales con formol al 10% a través de la técnica de perfusión intracardiaca, la cual consistió en realizar una incisión en el tórax para localizar el corazón. Se efectuó una incisión en la aurícula derecha y se adaptó un catéter calibre 27 en el ventrículo izquierdo para hacer circular solución salina con heparina durante 5 min, seguido de formol al 10% durante 10 min. Una vez que se fijó el animal, se removió el cráneo para extraer el cerebro, mismo que se colocó en viales con formol al 10% manteniéndolos durante una semana para asegurar la fijación completa y adecuada del cerebro.

En cada cerebro se realizaron cortes histológicos de 80µm por medio de un microtomo de congelación. Los cortes que contenían los sitios de microinyección fueron montados en portaobjetos etiquetados y previamente cubiertos con grenetina, estas laminillas fueron teñidas con la técnica de Nissl para resaltar somas neuronales. Esta técnica consistió en exponer el tejido cerebral a diferentes soluciones, bajo el siguiente tren de tinción: alcohol al 70% (5 min), alcohol al 80% (5 min), alcohol al 95% (5 min), agua destilada (5 min), tinción con violeta de cresilo (30 min), alcohol al 95% (1 min), alcohol al 95% acidulado (1 min), alcohol absoluto (3 min) y xilol (3 min). Inmediatamente después, las láminas teñidas se les aplicó bálsamo de Canadá para preservar el tejido y se les colocó un cubreobjetos.

Subsiguientemente, se determinaron los sitios de microinyección realizados en cada uno de los animales y se clasificaron según su anatomía.

Finalmente se procesaron los datos estadísticamente con la prueba de  $\chi^2$  con frecuencias esperadas iguales, para delimitar si existen o no diferencias significativas entre los tres grupos.

## **RESULTADOS**

### **a) Análisis de Resultados para el Grupo con Electrochoque Sólo**

Para el grupo con ECH sólo, el porcentaje de extensión (EXT) y mortalidad (MOR) después de la aplicación del ECH con una intensidad de 40 mA, una duración de 0.25 seg a ciclos cuadrados de 60 Hz fue de 100%, no obstante se analizó el porcentaje de EXT y MOR a intensidades de estímulo de 20 mA y 30

mA, con la misma frecuencia y duración del estímulo (**Gráfica 1**), encontrando un 0% de efecto para la EXT y MOR.

### **b) Porcentaje de Extensión en Diferentes Estructuras del Mesencéfalo**

Los resultados del porcentaje de EXT para la microinyección intracerebral de DFH o solución salina en estructuras mesencefálicas (**Fig. I**) son los siguientes.

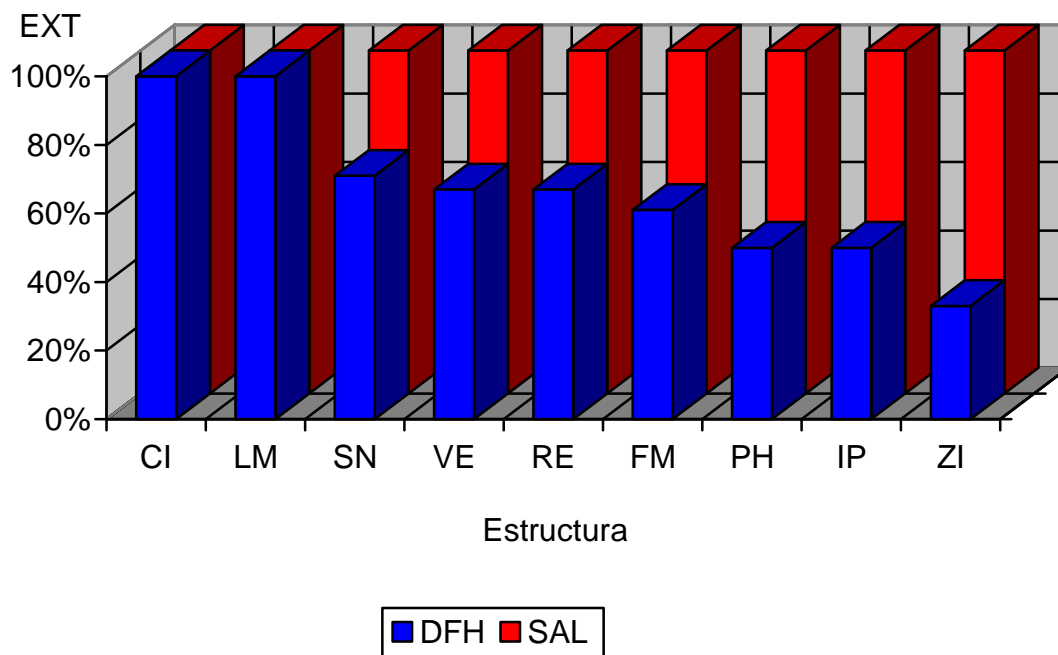
El grupo tratado con solución salina mostró que para todas las estructuras cerebrales analizadas, se presenta un 100% en la EXT después de la aplicación de un ECH, tales estructuras son: cápsula interna (CI); lemnisco medio (LM); substancia nigra reticulata (SN); núcleo ventral del tálamo (VE); núcleo reuniens talámico (RE); formación reticular mesencefálica (FM); núcleo posterior del hipotálamo (PH); núcleo interpeduncular (IP) y zona incerta (ZI) como se muestra en la **Gráfica 2**.

En el grupo tratado con DFH se encontró que en ciertas estructuras del mesencéfalo, tales como la CI y el LM se presentó un 100% de EXT después de la aplicación del ECH (**Gráfica 2**).

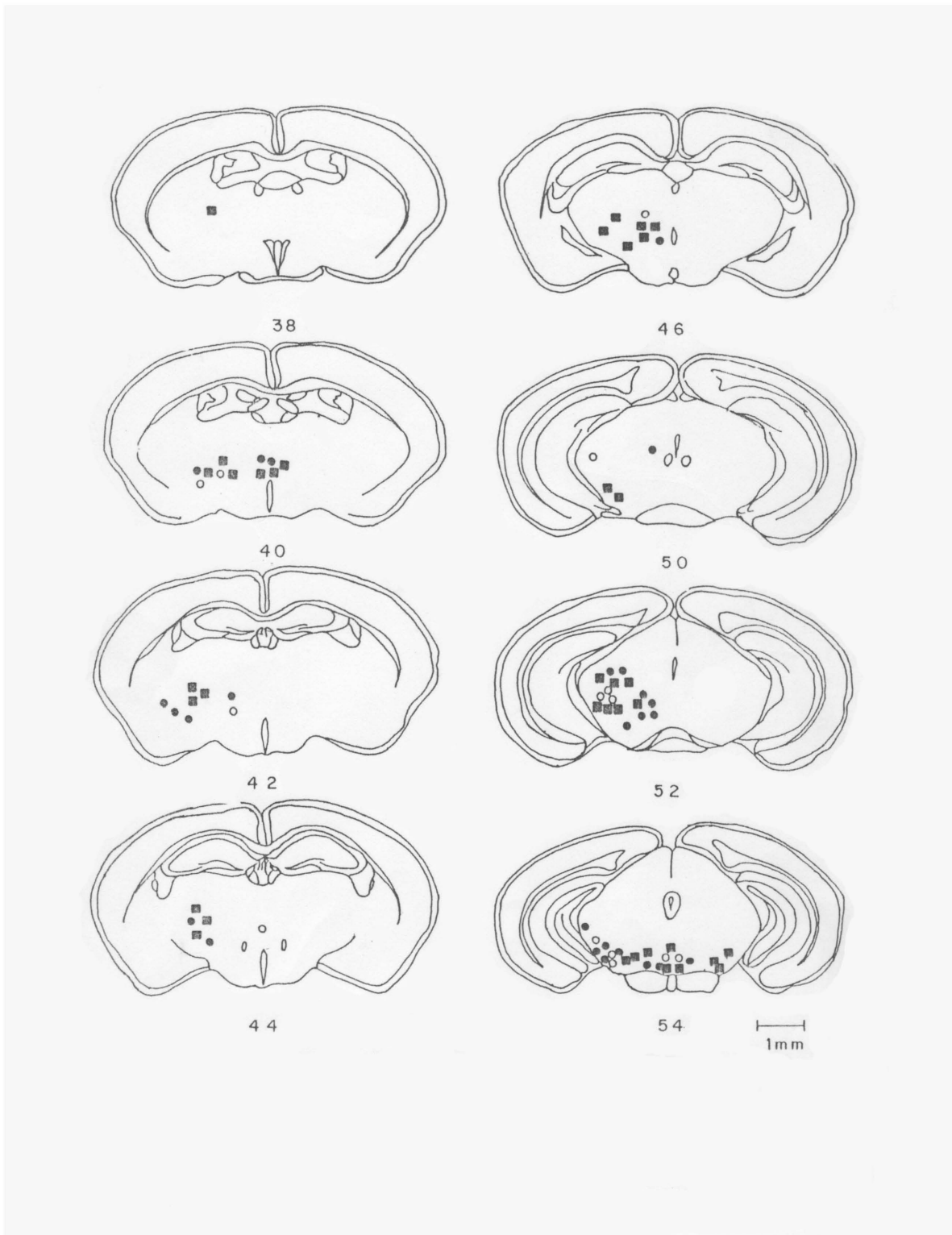
Sin embargo, existen otras estructuras mesencefálicas en donde se presentó protección ante el ECH cuando se administró DFH intracerebral, a continuación se presentan estas estructuras con su porcentaje de EXT correspondiente: ZI, 33%; IP y PH, 50%; FM, 61%; RE y VE, 67% y SN, 71% (**Tabla Ia**). Todas estas estructuras presentaron diferentes niveles de significancia y valores de  $ji^2$ , siendo la ZI la estructura con el decremento a la EXT más significativo con una  $ji^2$  de 33.75, y un nivel de significancia  $p \leq 0.00001$ , seguida por el IP y el PH con 16.66 de  $ji^2$  y una  $p \leq 0.00001$ . Siendo estas tres estructuras



las que presentaron los índices de mayor protección de todas las zonas cerebrales investigadas (**Tabla III**).



**Gráfica 2.** Porcentaje de EXT por ECH en diferentes estructuras mesencefálicas a los 20 minutos de la microinyección intracerebral de difenilhidantoína y solución salina.



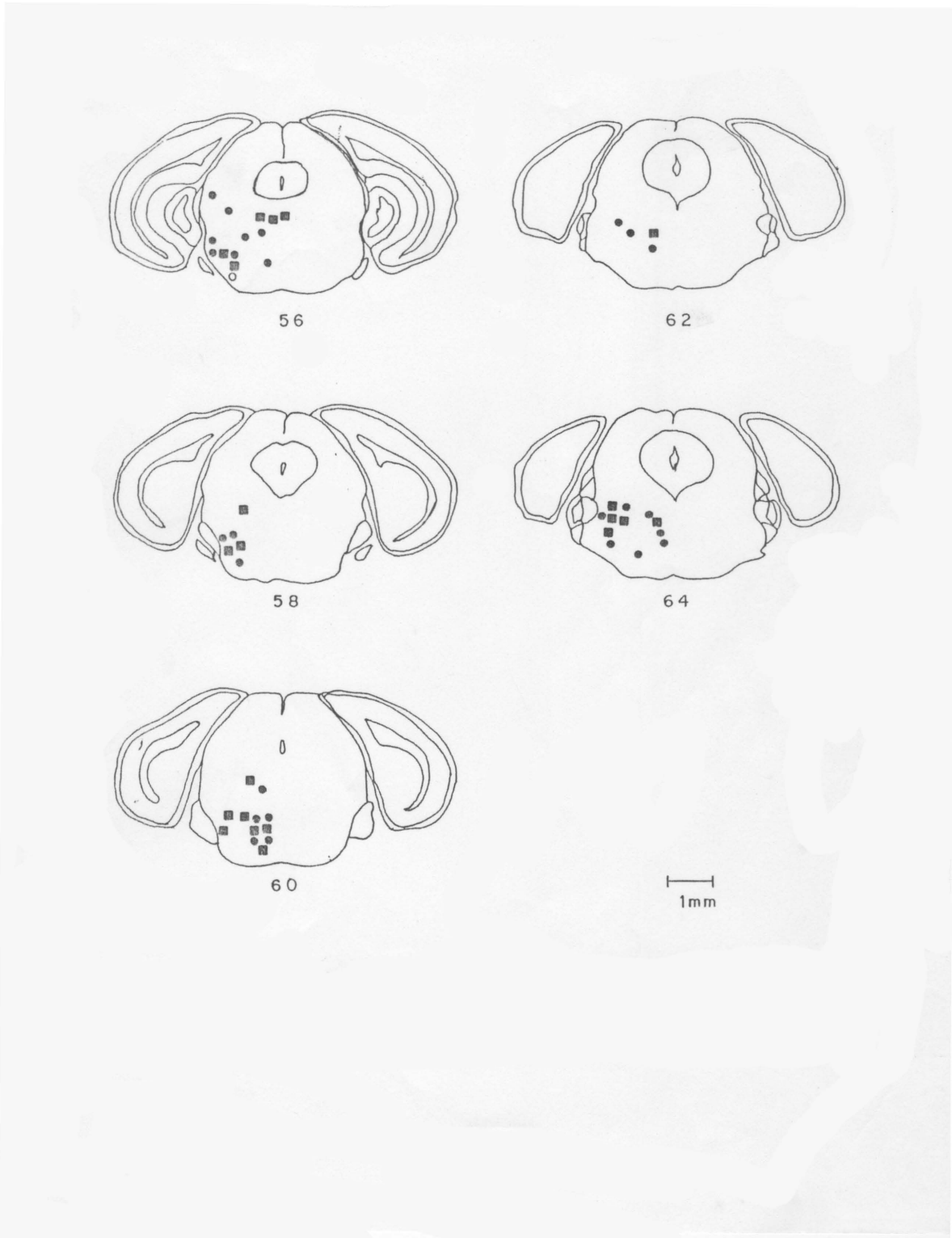
**Fig. 1.** Cortes transversales de cerebro de ratón que muestran las estructuras del mesencéfalo tratadas con microinyección de difenilhidantoína o solución salina ante el ECH; ■ Extensión solución salina, ● Extensión difenilhidantoína, ○ No extensión difenilhidantoína (el número en la parte inferior de cada corte representa la lámina correspondiente del Atlas Histológico de Sidman et al., 1971).

Estructura	Abr.	% EXT SAL	n	% EXT DFH	n	ji <sup>2</sup>	p
Zona Incerta	ZI	100	3	33	3	33.75	****
N. Interpeduncular	IP	100	3	50	4	16.66	****
N. Post. Hipotalámico	PH	100	3	50	4	16.66	****
Form. Ret. Mesencef.	FM	100	7	61	13	9.44	***
N. Reuniens Talámico	RE	100	3	67	3	6.52	**
N. Vent. del Tálamo	VE	100	3	67	3	6.52	**
Substancia Nigra Ret.	SN	100	4	71	7	4.91	*
Cápsula Interna	CI	100	3	100	3	0.00	NS
Lemnisco Medio	LM	100	3	100	3	0.00	NS

**Tabla Ia.** Porcentajes de EXT en diferentes estructuras mesencefálicas obtenidos para los grupos tratados con DFH y solución salina. Abr= abreviatura, DFH= difenilhidantoína, EXT= extensión, ji<sup>2</sup>= ji cuadrada para frecuencias esperadas iguales, NS= no significativo, p= nivel de significancia, SAL= solución salina, n= número de animales tratados, \*\*\*\*= p≤ 0.00001, \*\*\*= p≤ 0.002, \*\*=p≤ 0.01, \*= p≤ 0.03.

### c) Porcentaje de Extensión en Diferentes Estructuras del Puente

En cuanto a las diferentes estructuras pontinas tratadas con DFH o solución salina se observaron los siguientes porcentajes de EXT. En el grupo tratado con solución salina se presentó un 100% de EXT después de la aplicación del ECH, las estructuras fueron las siguientes: formación reticular pontina (FP), lemnisco lateral (LL), núcleo rojo (NR), pedúnculo cerebral (PC) y tracto tectoespinal (TT) como se muestra en la **Gráfica 3**.



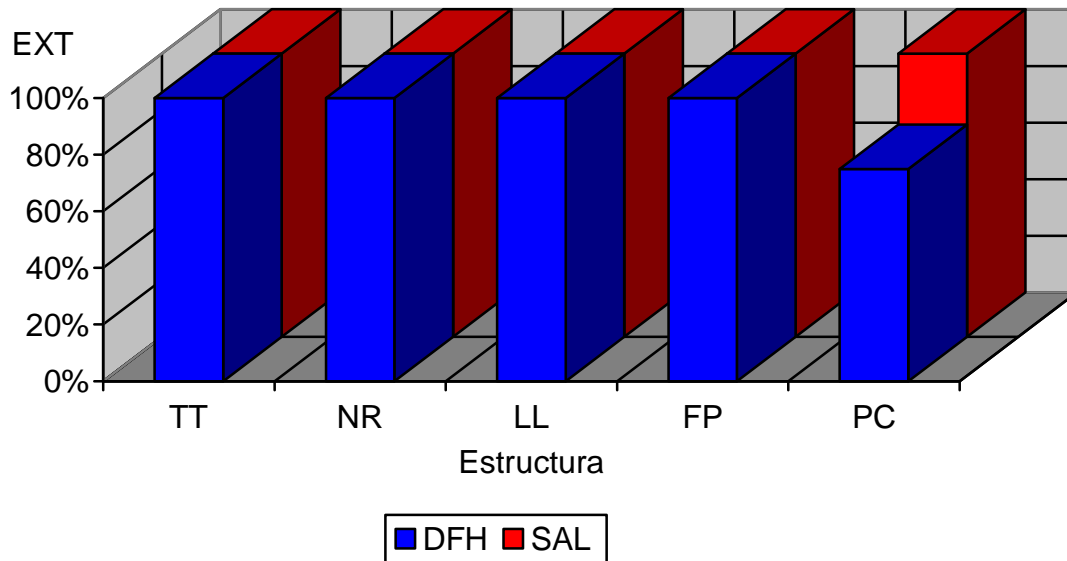
**Fig. II.** Cortes transversales de cerebro de ratón que muestran las estructuras del puente tratadas con microinyección de difenilhidantoína o solución salina ante el ECH; ■ Extensión Solución Salina, ● Extensión difenilhidantoína, ○ No extensión difenilhidantoína (el número en la parte inferior de cada corte representa la lámina correspondiente del Atlas Histológico de Sidman et al., 1971).

Así, en el grupo de DFH se encontró que en ciertas estructuras del puente, tales como la FP, el LL, el NR y el TT se presentó un 100% de EXT después de la aplicación del ECH.

Sin embargo, en el PC se mostró un 75% de EXT ante el ECH cuando se administró DFH intracerebral (**Tabla Ib**), presentando una  $ji^2$  de 3.57 y una “p” no significativa, encontrando así que ninguna de las estructuras tratadas en el puente con DFH presentó protección ante la aplicación del ECH (**Tabla III**).

Estructura	Abr.	% EXT SAL	n	% EXT DFH	N	$ji^2$	P
Pedúnculo Cerebral	PC	100	4	75	3	3.57	NS
Form. Ret. Pontina	FP	100	15	100	12	0.00	NS
Lemnisco Lateral	LL	100	3	100	3	0.00	NS
N. Rojo	NR	100	2	100	2	0.00	NS
Tracto Tectoespinal	TT	100	2	100	2	0.00	NS

**Tabla Ib.** Porcentajes de EXT en diferentes estructuras pontinas obtenidos para los grupos tratados con DFH y solución salina. Abr= abreviatura, DFH= difenilhidantoína, EXT= extensión,  $ji^2$ =  $ji$  cuadrada para frecuencias esperadas iguales, NS= no significativo, p= nivel de significancia, SAL= solución salina, n= número de animales tratados.



**Gráfica 3.** Porcentaje de EXT por ECH en diferentes estructuras pontinas a los 20 minutos de la microinyección de difenilhidantoína o solución salina.

#### d) Porcentaje de Extensión en Diferentes Estructuras del Bulbo

Los porcentajes de EXT para la microinyección intracerebral de DFH o solución salina en diferentes estructuras bulbares (**Fig. III**) son los siguientes.

En el grupo de solución salina se encontró que para todas las estructuras cerebrales analizadas, se presenta un 100% de EXT después de la aplicación del ECH, tales estructuras son la formación reticular bulbar (FB) y el fascículo longitudinal medio (FL), tal como se puede observar en la **Tabla Ic**.

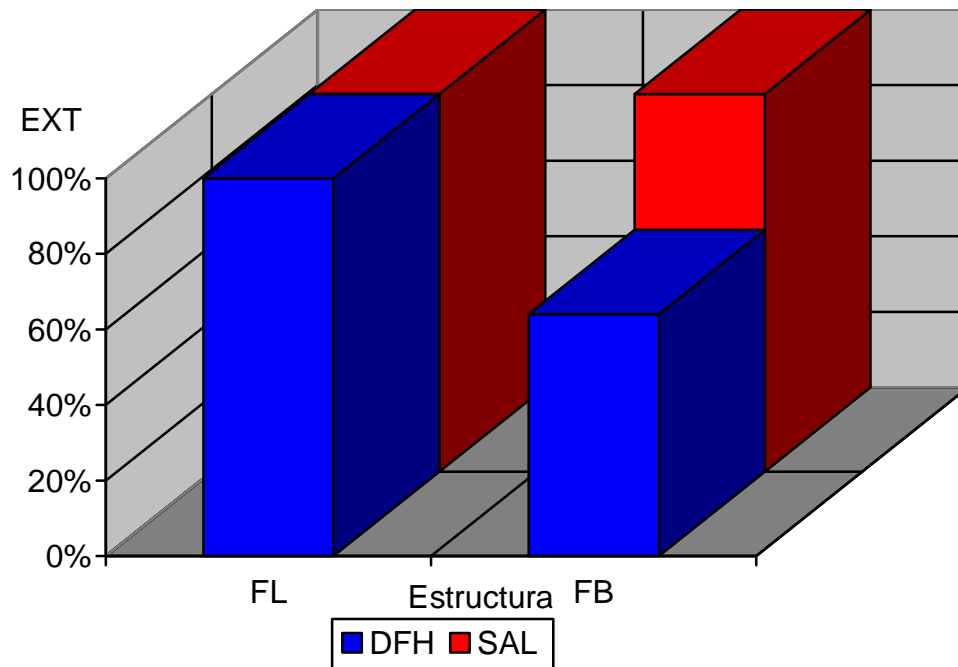
Por otro lado, en el grupo con DFH se observó que en el FL se obtuvo un 100% de EXT después de la aplicación del ECH. Sin embargo, en la FB se mostró un 64% de extensión ante el ECH (**Grafica 4**), encontrando además una  $ji^2$  de 7.90 con una  $p \leq 0.0002$  siendo esta estructura la única que presentó una protección significativa ante el ECH a nivel del bulbo (**Tabla III**).



**Fig. III.** Cortes transversales de cerebro de ratón que muestran las estructuras del bulbo tratadas con microinyección de difenilhidantoína o solución salina ante el ECH; ■ Extensión Solución Salina, ● Extensión difenilhidantoína, ○ No extensión difenilhidantoína (el número en la parte inferior de cada corte representa la lámina correspondiente del Atlas Histológico de Sidman et al., 1971).

Estructura	Abr.	% EXT SAL	n	% EXT DFH	N	ji <sup>2</sup>	P
Form. Ret. Bulbar	FB	100	7	64	11	7.90	***
Fascículo Long. Medio	FL	100	3	100	3	0.00	NS

**Tabla Ic.** Porcentajes de EXT en diferentes estructuras bulbares obtenidos para los grupos tratados con difenilhidantoína y solución salina. Abr= abreviatura, DFH= difenilhidantoína, EXT= extensión, ji<sup>2</sup>= ji cuadrada para frecuencias esperadas iguales, NS= no significativo, p= nivel de significancia, SAL= solución salina, n= número de animales tratados, \*\*\*= p≤ 0.002.



**Gráfica 4.** Porcentaje de EXT por ECH en diferentes estructuras bulbares a los 20 minutos de la microinyección de difenilhidantoína o solución salina.



### e) Porcentaje de Mortalidad en Diferentes Estructuras del Mesencéfalo

Los resultados del porcentaje de MOR para la microinyección intracerebral de DFH o solución salina en diferentes estructuras mesencefálicas (**Fig. I**) se describen a continuación.

En el grupo tratado con solución salina, el porcentaje de MOR fue de 100 para las siguientes estructuras: FM, LM, IP, PH, VE, SN, y ZI. Sin embargo, la CI y el RE presentaron una MOR de 33% y 67% respectivamente (**Tabla Ila**).

Estructura	Abr.	% MOR SAL	n	% MOR DFH	n	$\chi^2$	P
Form. Ret. Mesencef.	FM	100	7	8	13	78.37	****
Zona Incerta	ZI	100	3	33	3	33.75	****
N. Interpeduncular	IP	100	3	50	4	16.66	****
N. Post. Hipotalámico	PH	100	3	50	3	16.66	****
Substancia Nigra Ret.	SN	100	4	57	7	11.77	***
Cápsula Interna	CI	33	3	33	3	00.00	NS
N. Reuniens Talámico	RE	67	3	67	3	00.00	NS
N. Ventral del Tálamo	VE	100	3	100	3	00.00	NS
<b>Lemnisco Medio</b>	LM	100	3	100	4	00.00	NS

**Tabla Ila.** Porcentajes de MOR en diferentes estructuras mesencefálicas obtenidos para los grupos tratados con difenilhidantoína y solución salina. Abr= abreviatura, DFH= difenilhidantoína, MOR= mortalidad,  $\chi^2$ = ji cuadrada para frecuencias esperadas iguales, NS= no significativo, p= nivel de significancia, SAL= solución salina, n= número de animales tratados, \*\*\*\*=  $p \leq 0.00001$ , \*\*\*=  $p \leq 0.002$ .

Por otro lado, en el grupo con tratamiento de DFH se mostró un 100% de MOR en el LM. En este grupo, se mostró en la FM un 8% de MOR ( $\chi^2$ = 78.37 y

una  $p \leq 0.00001$ ), en la ZI ( $ji^2 = 33.75$  y una  $p \leq 0.00001$ ) tanto para el IP como para el PH se obtuvo un 50% de MOR ( $ji^2 = 16.66$  y  $p \leq 0.00001$ ), así también en la SN se observó un 57% de MOR ( $ji^2 = 11.17$  y  $p \leq 0.002$ ), finalmente en la CI, el RE, el VE y el LM presentaron una  $ji^2$  de 0, siendo no significativa.

#### f) Porcentaje de Mortalidad en Diferentes Estructuras del Puente

En cuanto a las diferentes estructuras pontinas tratadas bajo DFH o solución salina se observaron los siguientes porcentajes de MOR (**Fig. II**). En el grupo tratado con solución salina se presentó un 100% de MOR después de la aplicación del ECH, tales estructuras son: LL, NR, PC y TT. Sin embargo, en la FP se observó un 92% de MOR (**Tabla IIb**).

Por otra parte, en el grupo de DFH se encontró que en ciertas estructuras del puente, tales como el LL, el NR y el TT se presentó un 100% de MOR después de la aplicación del ECH.

No obstante, la FP mostró un 53% de MOR ( $ji^2 = 10.48$  y  $p \leq 0.002$ ), el PC presentó un 50% de MOR ante el ECH ( $ji^2 = 16.66$  y  $p \leq 0.00001$ ) cuando se administró DFH.

Estructura	Abr.	% MOR SAL	n	% MOR DFH	n	$ji^2$	p
Pedúnculo Cerebral	PC	100	3	50	4	16.66	****
Form. Ret. Pontina	FP	92	12	53	15	10.48	***
Lemnisco Lateral	LL	100	3	100	3	00.00	NS
N. Rojo	NR	100	2	100	2	00.00	NS
Tracto Tectoespinal	TT	100	2	100	2	00.00	NS

**Tabla IIb.** Porcentajes de MOR en diferentes estructuras pontinas obtenidos para los grupos tratados con difenilhidantoína y solución salina. Abr= abreviatura, DFH= difenilhidantoína,  $ji^2 = ji$  cuadrada para frecuencias esperadas iguales, MOR= mortalidad, NS= no significativo, p= nivel de significancia, SAL= solución salina, n= número de animales tratados, \*\*\*\*=  $p \leq 0.00001$ , \*\*\*=  $p \leq 0.002$ .

### g) Porcentaje de Mortalidad en Diferentes Estructuras del Bulbo

Los resultados para la microinyección intracerebral de DFH o solución salina en diferentes estructuras bulbares (**Fig. III**) son los siguientes: en el grupo con tratamiento de solución salina se encontró un 100% de MOR para el FL, y un 75% de MOR en la FB, teniendo estas dos estructuras una  $\chi^2 = 0$ , no significativa (**Tabla IIc**).

Por otro lado, en el grupo con DFH se encontró que el FL tuvo un 100% de MOR después de la aplicación de un ECH. Sin embargo, en la FB se mostró un 64% de MOR ante el ECH ( $\chi^2 = 0$ , no significativa).

Estructura	Abr.	% MOR SAL	n	% MOR DFH	n	$\chi^2$	p
Form. Ret. Bulbar	FB	75	11	64	7	00.00	NS
Fascículo Long. Medio	FL	100	3	100	3	00.00	NS

**Tabla IIc.** Porcentajes de MOR en diferentes estructuras bulbares obtenidos para los grupos tratados con DFH y solución salina. Abr= abreviatura, DFH= difenilhidantoína,  $\chi^2$ = ji cuadrada para frecuencias esperadas iguales, MOR= mortalidad, NS= no significativo, p= nivel de significancia, SAL= solución salina, n= número de animales tratados.

Estructura	Abr.	% EXT SAL	% EXT DFH	$\chi^2$	p
Zona Incerta	ZI	100	33	33.75	****
N. Interpenducular	IP	100	50	16.66	****
N. Post. Hipotalámico	PH	100	50	16.66	****
Form. Ret. Mesencef.	FM	100	61	9.44	***
Form. Ret. Bulbar	FB	100	64	07.90	***
N. Reuniens Talámico	RE	100	67	06.52	**
N. Ventral del Tálamo	VE	100	67	06.52	**
Sustancia Nigra	SN	100	71	04.91	*
Pedúnculo Cerebral	PC	100	75	03.57	NS
Cápsula Interna	CI	100	100	00.00	NS
Lemnisco Medio	LM	100	100	00.00	NS
Form. Ret. Pontina	FP	100	100	00.00	NS
Lemnisco Lateral	LL	100	100	00.00	NS
N. Rojo	NR	100	100	00.00	NS
Fásciculo Long. Medio	FL	100	100	00.00	NS
Tracto Tectoespinal	TT	100	100	00.00	NS

**Tabla III.** Potencialidad de la difenilhidantoína ante las crisis inducidas por ECH, las estructuras cerebrales están acomodadas de mayor a menor grado de potencia de acuerdo con el patrón conductual valorado de extensión. Abr.= abreviatura, DFH= difenilhidantoína,  $\chi^2$ = ji cuadrada para frecuencias esperadas iguales, NS= no significativo, p= nivel de significancia, SAL= solución salina, n= número de animales tratados, \*\*\*\*=  $p \leq 0.00001$ , \*\*\*=  $p \leq 0.002$ , \*\*=  $p \leq 0.01$ , \*=  $p \leq 0.03$ .

## DISCUSION

### a) Microinyección con Difenilhidantoína y Solución Salina en Relación al Porcentaje de Extensión

Las estructuras mesencefálicas, pontinas y bulbares que corresponden al grupo tratado con solución salina mostraron un 100% de EXT (**Tablas la, lb y lc**), lo cual sugiere que la microinyección intracerebral de solución salina (0.5 $\mu$ l) no ejerce efecto protector ante la aplicación de un ECH vía corneal, ésto muestra que la inyección intracerebral de solución salina, así como la lesión cerebral en cada estructura valorada no altera el patrón conductual de crisis generalizadas producidas por un ECH. Esto apoya lo que menciona **Browing et al. (1989)**, de que transectos hechos en el tallo cerebral justo sobre el cerebro medio no bloquean la inducción de crisis por ECH. Sin embargo, existen otros estudios (**Jiannai et al., 1969; Gale, 1986**) que proponen a la FM y SN como sitios donde las lesiones cerebrales pueden ocasionar un efecto bloqueador ante las crisis.

Por otro lado, en el grupo de DFH se encontró que estructuras correspondientes a la región mesencefálica del tallo cerebral como la CI y el LM no presentaron ningún efecto protector a la EXT inducida por ECH, ya que se observó un 100% de la misma (**Tabla la**), indicando que en estos sitios la DFH no ejerce acción anticonvulsiva. Sin embargo, existen otras estructuras mesencefálicas donde la DFH ejerce un efecto protector al ECH. El sitio de mayor protección antiepiléptica ejercida por la DFH es la ZI, donde se observó una reducción del 77% a la EXT, es decir, sólo el 33% de los animales presentaron extensión cuando se inyectó DFH en la ZI. Otras regiones con protección fueron el

IP y el PH con 50% de EXT, la FM con 61% de EXT, el RE y el VE con 67% de EXT y la SN con 71% de EXT (**Tabla Ia**). La propuesta de que la FM inhibe la inducción de crisis epilépticas es apoyada por **Faingold (1987)** donde observa que la administración eléctrica convulsiva en la FM incrementa la actividad epiléptica. Asimismo, **McNamara (1983)** y **Le Gal La Salle (1983)** identifican que la SN es el sitio crítico del mesencéfalo para la actividad anticonvulsiva mediada por GABA, por tal razón puede existir la posibilidad de que haya una relación entre el mecanismo de acción de la DFH hacia el GABA, lo cual hasta el momento se desconoce.

Con respecto a las estructuras talámicas (PH, RE y VE) **Gioanni (1991)** registra que las estructuras de la parte media del tálamo producen crisis por estímulos de larga intensidad, lo que lleva a pensar que estas estructuras, al presentar índices de protección por la administración de DFH, son sitios importantes para este fármaco, asimismo, las vías de la FR al tálamo (**Lawrence et al., 1982**) pueden relacionarse con la actividad anticonvulsiva de las estructuras talámicas, además, se considera la posibilidad de que la SN regule la función motora por medio de la modulación de las neuronas de relevo talámicas que inervan a la corteza motora, por lo que también pueden estar relacionadas ambas estructuras en la mediación de crisis generalizadas. En cuanto al resto de las estructuras correspondientes a la región mesencefálica (ZI, IP y PH) parecen indicar que ejercen una importante función inhibitoria ante las crisis inducidas por ECH mediado por la DFH, no obstante, no se tiene ningún antecedente que proponga a estas estructuras como mediadores de crisis generalizadas.

Con respecto a las estructuras pontinas del grupo de DFH (PC, FP, LL, NR y TT) se encontró un 100% en la EXT, lo que sugiere que dichas estructuras no presentan ningún papel importante de la DFH en el control de crisis generalizadas (**Gráfica 3**).

Adicionalmente, en el grupo de DFH se encontró a la PC con un efecto protector ante el ECH de 75% de EXT, lo cual no es significativo (**Tabla Ib**).

Por otro lado, en relación a la región bulbar se observó que el FL presenta un 100% de EXT con solución salina y DFH mostrando una protección nula al ECH. Mientras que la FB muestra un efecto protector ante el ECH de 64% de EXT, lo que indica que esta zona cerebral presenta un porcentaje considerable para la modulación de crisis por medio de la microinyección de DFH intracerebral (**Tabla Ic**).

Finalmente, es importante mencionar que este trabajo propone sitios de acción donde la DFH administrada intracerebralmente regula las crisis producidas por ECH (**Fig. I, II y III**). Además, se reportan las estructuras cerebrales donde ésta no presenta acción. Esto sugiere efectos específicos para determinadas regiones del cerebro. Este estudio no descarta otros sitios que no se estudiaron y que es posible que puedan presentar o no índices de protección epiléptica a través de la microinyección intracerebral de DFH. No obstante, las estructuras donde se encontró ausencia de protección a las crisis pueden ser activas ante otros fármacos anticonvulsivos.

## **b) Microinyección con Difenilhidantoína y Solución Salina en Relación al Porcentaje de Mortalidad**

El patrón conductual de MOR es un criterio que se valoró con el fin de determinar la potencialidad anticonvulsiva del fármaco en los animales que presentan extensión después de un ECH, ya que todos los animales experimentales que presentaron MOR tuvieron una EXT previa a ésta, asimismo, los animales que sobrevivieron al recuperarse de la EXT presentaron una etapa clónica de los miembros posteriores.

En cuanto a las estructuras que presentaron un 100% de MOR tanto para el grupo de DFH como el de solución salina fueron: FL, LL, VE, LM, NR y TT (**Tablas IIa, IIb y IIc**). Ésto indica que para estas estructuras, la efectividad anticonvulsiva del fármaco sólo se encuentra en la EXT, por lo que se sugiere que la DFH no ejerce efecto adicional en este período de la crisis.

Por otra parte, los resultados muestran un grupo de estructuras donde se presentó reducción de MOR para el grupo de DFH solamente (FM 8%, ZI 33%, IP 50%, PH 50%, PC 50%, SN 57%, FP 53%), dentro de estas estructuras para el grupo de solución salina se mantuvo un 100% de MOR excepto FP con un 92% de MOR (**Tablas IIa, IIb y IIc**). Esto indica que la DFH ejerce un efecto adicional ante este período de crisis, reforzando la potencialidad de la acción de este fármaco en estas regiones cerebrales de acuerdo con la prueba de  $\chi^2$  y los valores de significancia respectivos.

La FB (64% de MOR-DFH, 75% MOR-SAL) presentó una reducción de MOR para los grupos de DFH y solución salina (**Tabla IIc**). Estos datos sugieren



que, aunque hubo disminución de MOR en ambos grupo (DFH y solución salina) el resultado no es significativo.

Posteriormente, se encontró que la CI (33% de MOR para DFH y SAL) y el RE (67% de MOR para DFH y SAL) presentan un porcentaje de MOR idéntico para el grupo de DFH y Solución salina (**Tabla IIa**), lo que podría sugerir que la potencialidad antiepiléptica sea debida a la lesión cerebral de estas estructuras.

### **c) Asociación de las Estructuras Inyectadas con Difenilhidantoína en Relación a los Parámetros Conductuales de Extensión y Mortalidad**

Analizando los datos con base en el porcentaje de EXT primeramente, como un parámetro de valoración conductual del efecto antiepiléptico, y en segundo término a la MOR como un parámetro conductual adicional ante el modelo experimental de epilepsia con ECH, así, estos dos criterios nos son útiles para determinar en una forma más precisa, junto con los valores de  $ji^2$  y p, el índice de potencialidad de la DFH ante las crisis inducidas por ECH (**Tabla III**).

Con lo observado a través de estos parámetros, se determinó que de acuerdo con su acción, la DFH presenta un alto grado de potencialidad antiepiléptica en la ZI, el IP y el PH. Y en menor grado en la FM, la FB, el RE, el VE y la SN, además se encontró que en ciertas estructuras cerebrales como son el PC, la CI, el LM, la FP, el LL, el NR, el FL y el TT no se manifestó en ninguno de los dos patrones analizados índices de protección por parte de la DFH ante el modelo de ECH en el ratón (**Tabla III**). Esto indica que la DFH presenta una acción selectiva en algunas estructuras cerebrales, ocasionando diferentes grados de potencia de acuerdo al sitio de microinyección intracerebral.

Por otro lado, existe la posibilidad de que las vías aferentes de las estructuras que presentan una alta potencialidad para bloquear crisis inducidas por ECH con DFH, ejercen una influencia hacia otras estructuras cerebrales en el ratón.

#### **d) Relación de la Intensidad de Estímulo con los Parámetros Conductuales**

##### **Presentados en la Cepa NIH**

Es importante mencionar que para determinar el umbral convulsivo inducido por ECH, los factores biológicos como la edad, dieta, ritmo circadiano, temperatura, cepa, entre otros, pueden influir considerablemente en el patrón conductual de la crisis, así como el umbral convulsivo (**Löscher et al., 1991a**). En este estudio, el umbral convulsivo inducido por ECH en ratones de la cepa NIH fue de 40 mA, con una duración de estímulo de 0.25 seg a ciclos de 60 Hz (**Gráfica 1**). El patrón conductual presentado en estos animales solamente consistió de una flexión de los miembros posteriores seguida inmediatamente por una extensión tónica de los mismos. En este grupo, todos los animales murieron después de la extensión tónica, indicando la efectividad de la intensidad para producir crisis en esta cepa de ratones y dentro de un peso de 25-35 g, esto asegura que la modificación de este porcentaje en los ratones de ambos grupo son debido a la influencia de la administración intracerebral de DFH o a la lesión cerebral efectuada por la microinyección intracerebral de solución salina.

El patrón conductual en esta cepa de roedores puede ser distinto al que pueden presentar otras cepas de ratones, o bien, dentro de la misma cepa pueden existir modificaciones en el patrón conductual debido a factores biológicos en que

estén sometidos los animales, aunque consideramos que estas modificaciones dentro de la misma cepa pueden ser mínimas. Sin embargo, entre las diferentes cepas de ratones no solamente puede variar el patrón conductual, sino también la intensidad del estímulo para inducir una crisis generalizada por ECH.

Finalmente, es importante considerar la relación inherente entre la DFH y el modelo de ECH, ya que este fármaco no ejerce ningún efecto ante los modelos químicos de PTZ, estricnina y picrotoxina (**Fisher, 1989**). Ésto puede estar relacionado con el sitio de acción de la DFH, que probablemente sea diferente al que presenten estos químicos, y además no exista ningún mecanismo en común que pueda dar un efecto agonista.

## CONCLUSIONES

1. La DFH no ejerce ningún efecto antiepiléptico en sitios del tallo cerebral como son: PC, CI, LM, FP, LL, NR, FL y TT en cuanto a los parámetros conductuales observados (EXT y MOR).
2. La importancia de algunas estructuras del tallo cerebral como núcleos específicos para la acción antiepiléptica de la DFH se centra en la ZI, el IP y el PH. Siendo estas estructuras las que presentan un mayor efecto protector ante crisis inducidas por ECH.
3. La FM, la FB, el RE, el VE y la SN son zonas del tallo cerebral que manifiestan un grado de potencialidad moderado para bloquear crisis generalizadas inducidas por ECH.
4. La DFH presenta un gradiente sinérgico para inhibir las crisis generalizadas bajo el modelo de ECH, en diferentes estructuras del tallo cerebral del

ratón, por lo que el efecto inhibitor de este fármaco no es generalizado, sino local; sin embargo, el efecto sobre vías motoras importantes puede mimetizar un efecto general, pudiendo influir en núcleos donde la DFH no presenta ninguna acción directa.

5. Es probable que la DFH presente otros sitios de acción no comprendidos en este estudio, estos sitios podrían encontrarse en distintas regiones cerebrales del ratón, por lo que es necesario valorar otras regiones cerebrales y sus estructuras.
6. Existe la posibilidad de elevar el efecto inhibitorio de la DFH ante el modelo del ECH por medio de la administración simultánea de este fármaco en los sitios donde la DFH ejerce un efecto considerable para abolir las crisis generalizadas, sin embargo, esta hipótesis debe ser confirmada experimentalmente.
7. Es probable que la microinyección intracerebral bilateral de DFH en las estructuras de acción de la misma aumente el grado de potencialidad de este fármaco, por lo que es importante que este postulado se lleve a la experimentación para ser comprobado.
8. Las lesiones cerebrales en las estructuras analizadas en este trabajo, mostraron que no ejercen ningún efecto protector ante las crisis inducidas por ECH en el ratón.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aarli, J. A., Drug-induced IgA deficiency in epileptic patients, *Arch. Neurol.*, (1976) 76: 296-299.
- Aarli, J. A., (1980), Effects of phenytoin in the immune system. In: Phenytoin-induced teratology and gingival pathology, Edited by T. M. Hessel, M. C. Johnston, and K. H. Dudley. Raven Press, New York.
- Agarwal, B. N., Cabebe, F. G. & Hoffman, B. I., Diphenylhydantoin-induced acute renal failure. *Nephron*, (1977) 18: 249-251.
- Ahmed, S., Laidlaw, J., Houghton, G. W. & Richens, A., Involuntary movements caused by phenytoin intoxication in epileptic patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, (1975) 38: 225-231.
- Ahn, J. E., Cloyd, J. C., Brundage, R. C., Marino, S. E., Conway, J. M., Ramsay, R. E., White, J. R., Musib, L. C., Rarick, J. O., Birnbaum, A. K & Leppik, I. E., Phenytoin half-life and clearance during maintenance therapy in adults and elderly patients with epilepsy. *Neurology*. (2008); 71 (1): 38-43.
- Aickin, C. C., On the action of the anticonvulsant 5,5- diphenylhydantoin and the convulsant picrotoxin in crayfish stretch receptor. *J. Physiol. (Lond)*, (1981) 315: 157-173.
- Anderson, J. R. & Raines, A., Selective diphenylhydantoin suppression of auditory evoked potentials in the cat cerebellar cortex. *Neurophar.*, (1974) 13: 749-754.
- Andreasen, P. B., Lyngbye, J. & Trolle, E., Abnormalities in liver functions tests during long-term diphenylhydantoin therapy in epileptic patients. *Acta Med. Scand.*, (1973) 194: 261-264.
- Armijo, J. A., Shushtarian, M., Valdizan, E. M., Cuadrado, A., De las Cuevas, I. & Adin, J., Ion Channels and epilepsy. *Curr. Pharm. Des.*, (2005) 11: 1975-2003.
- Bancaud J., Talarich J., Morel P., Bresson M., Bonis A., Geier S., Hemon E. & Buser P., "Generalized" epileptic seizures elicited by electrical stimulation of the frontal lobe in man. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, (1974) 37: 275-282.
- Beckstead, R. M., Domesick, V. B. & Nauta, W. J. II. Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res.* (1979) 27: 961-987.

- Bell, R. D., Pak, C. Y., Zerwekh, J., Barilla, D. E. & Vasko, M., Effect of phenytoin on bone and vitamin D metabolism. *Ann. Neurol.* (1979) 5: 374-378.
- Bennewitz, M. F. & Saltzman, W. M., Nanotechnology for the delivery of drugs to the brain for epilepsy. *Neurotherapeutics.* (2009) April; 6(2): 323-336.
- Bergmann, F., Costin, A. & Gutman, J., A low threshold convulsive area in the rabbit's mesencephalon, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, (1963) 15: 683-690.
- Bodensteiner, J. B., Asterixis associated with sodium valproate. *Neurology*, (1981) 31: 194-195.
- Boernink, D. H. & Miller, J. J., Anticonvulsant-induced antinuclear antibodies and lupus-like disease in children. *J. Pediatr.* (1973) 82: 113-117.
- Bonhaus, D. W., Walters, J. R. & McNamara, J. O., Activation of substantia nigra neurons: role in the propagation of seizures in kindled rats, *J. Neurosci.*, (1986) 6: 3124-3030.
- Bourlond, A., Lupus erythemateux chronique et traitement antiepileptique. *Arch. Belges Dermatol.* (1970) 26: 575-578.
- Brailowsky, S., Silva-Barrat, C. & Naquet, R., Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: aportaciones recientes de la investigación experimental. *Salud Mental.* (1989) 12 (1): 53-62.
- Brailowsky, S., (1991). *Epilepsia experimental*. Eds. S. Brailowsky, E. Otero-Siliceo. México, 295 pp.
- Brodal, A., (1981). *Neurological Anatomy*. Oxford University Press, New York. pp. 240.
- Brodie, J. M., Feely, J., Adverse drugs interactions. *Br. Med. J.*, (1988) 296: 845-849.
- Brodie, J. M., Drug Interactions in Epilepsy. *Epilepsia*, (1992) 33 (Suppl. 1): S13-S22.
- Browning, R. A & Faingold, C. L., Antagonisms of experimentally induced tonic seizures following a lesion of the midbrain tegmentum. *Epilepsia.* (1981) 22: 595-601.
- Browning, R. A., (1987). Effect of lesions on seizures in experimental animals. In Fromm, G. H., Faingold, C. L., Browning, R. A. & Burnham, W. M. (Eds.), *Epilepsy and the reticular Formation: The role of the reticular Core in Convulsive Seizures*. Liss, New York. pp 137-162.

- Browning, R. A., Lanker, M. L. & Faingold, C. L., Injections of noradrenergic and GABAergic agonists into the inferior colliculus: effects on audiogenic seizures In genetically epilepsy-prone rats, *Epilepsy Res.*, (1989) 4: 119-125.
- Buchtal, F. & Lennox-Buchtal, M. A., (1972) *Antiepileptic drugs*, edited by D. M. Woodbury, J. K. Penry, and R. P. Schmidt, Raven Press, New York. pp. 193-209.
- Burnham, W. M. Core mechanisms in generalized convulsions. *Fed. Proc.* (1985) 44: 2442-2445.
- Burnham, W. M. (1987). Electrical stimulation studies: Generalized convulsions triggered from the brain stem. In Fromm, G. H., Faingold, C. L., Browning, R. A. & Burnham, W. (Eds.). *Epilepsy and the Reticular Formation. The Role of the Reticular Core in Convulsive Seizures*, Liss. New York. pp. 25-38.
- Catterall, W. A., Inhibition of voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells by antiarrhythmic drugs, *Mol. Pharmacol.* (1981) 20: 356-362.
- Cesa-Bianchi, M. G., Mancina, M. & Mutani, R. Experimental epilepsy induced by cobalt powder in lower brain-stem and thalamic structures. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* (1967) 22: 525-536.
- Collins, R. L., (1972). Audiogenic seizures. In: *Experimental Models of Epilepsy*, Edited by D. P. Purpura, J. K. Penry, D. M. Woodbury and R. D. Walter. Raven Press, New York. pp. 347-372.
- Coombs, J. S., The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneuronal membrane that produce the inhibitory postsynaptic potential. *J. Physiol.* (1955) 130: 326-373.
- Conford, E. M., (1984). In *metabolism of antiepileptic drugs*: Levy, R. H., Pitlick, W. H., Eichlenbaum, M., Meijer, J., (Eds.), Raven Press, New York, pp. 129-142.
- Courtney, K. R. & Etter, E. F., Modulated anticonvulsant block of sodium channels in nerve and muscle. *Eur. J. Pharmacol.* (1983) 88: 1-9.
- Cuccinelli, S. A., Conney, A. H., Sansur, M. & Burns, J. J., Drug interactions in man, part 1 (Lowering effect of Phenobarbital on plasma levels of bishydroxycoumarin (Dicumarol) and diphenylhydantoin (Dilantin), *Clin pharmacy. Ther.*, (1965) 6: 420-429.

- Cudsworth, A. G. & Cunningham, J. J. L., The effect of diphenylhydantoin on insulin response. *Clin. Sci. Mol. Med.*, (1974) 46: 131-136.
- Cure, C., Rasmussen, T. & Jasper, H. H., Activation of seizures and electroencephalographic disturbances in epileptic and control subjects with "Metrazol". *Arch. Neurol. Psychiatr.*, (1948) 59: 691-717.
- Chadwick, D., & Reynolds, E. H., Anticonvulsant-induced dyskinesias: a comparison with dyskinesias induced by neuroleptics. *J. Neurol. Neurosurg.* (1976) 39: 1210- 1218.
- Chaiken, B. H., Dilantin sensitivity: report of a case of hepatitis with jaundice, Pyrexia and exfoliative dermatitis. *N. Engl. J. Med.* (1950) 242: 897-898.
- Chalhub, E. G., Phenytoin-induced dystonia and choreoathetosis in two retarded epileptic children. *Neurology*, (1976) 26: 494-498.
- Chambon, J. P., Hallot, A. & Biziere, K., (1986). CM 4907 and SR 41378: two piperidino-pyridazine derivatives. In: B. S. Meldrum & R. J. Porter (Eds.). *New anticonvulsant drugs*, Libbey, London. Pp. 313-316.
- Chiu, P. & Burnham, W. M., The effect of anticonvulsant drugs on convulsions triggered by direct stimulation of the brainstem. *Neuropharmacology*. (1982) 21: 355-359.
- Choy, Y., Effect of diphenylhydantoin on cortisol kinetics in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1971) 175: 27-34.
- Chweh, A. Y., Swinyard, E. A., Wolf, H. H. & Kupferberg, H. J., Effect of GABA agonists on the neurotoxicity and anticonvulsant activity of benzodiazepines, *Life sci.*, (1985) 36: 737-744.
- DeLorenzo, R. J., Calcium-dependent phosphorylation of specific synaptosomal fraction proteins: possible role of phosphoproteins in mediating neurotransmitter release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1976) 71: 590-597.
- Depaulis, A., Snead III, O. C., Marescaux, C. & Vergnes, M., suppressive effects of intranigral injection of muscimol in three models of generalized non-convulsive epilepsy induced by chemical agents, *Brain Res.*, (1989) 498: 64-72.
- Depaulis, A., Marescaux, C., Liu, Z. & Vergnes, M., The GABAergic nigro-collicular pathway is not involved in the inhibitory control of audiogenic seizures in the rat, *Neurosci. Lett.*, (1990) 111: 269-274.



-Diccionario Mosby de medicina, enfermería y ciencias de la salud. Versión en español de la 4ª edición de la obra original en inglés. Mosby, Inc. & Elsevier Imprint. (2006). Madrid España. 1509 pp.

-Dreifuss, F. E., (1983). Epilepsy. Adverse effects of antiepileptic drugs, Edited by A. A. Ward, Jr., J. K. Penry, & D. Purpura. Raven Press, New York. pp. 249-266.

-Druskin, M. S., Anticonvulsant-associated megaloblastic anemia. N. Eng. J. Med., (1962) 267: 483-485.

-Duggal, K. N. & Barasi, S., Investigation of the connection between the substantia nigra and the medullary reticular formation in the rat. Neurosci. Lett. (1983) 36: 237-242.

-Duplisse, B. R., Icchioni, A. L., Chin, L & Consroe, P. F., Relationship of the inferior colliculus and gammaaminobutyric acid (GABA) to audiogenic seizure in the rat, Fed. Proc., (1974) 33: 468.

-Eadie, M. J. & Tyrer, J. H., (1980). Anticonvulsant therapy: pharmacological basis and practice. Churchill Livingstone, Edinburgh.

-Esplin, d. W., Effects of diphenylhydantoin on synaptic transmission in the cat spinal cord and stellate ganglion. J. Pharmacol. Ex. Ther. (1957) 120: 301-323.

-Faingold, C. L., Strychnine effects on the sensory response patterns of the reticular formation neurons. Electroenceph. Clin. Neurophysiol, (1980) 50: 102-111.

-Faingold, C. L., Hoffman, W. E. & Caspary, D. M., Bicucculline-induced enhancement of sensory responses and cross-correlations between reticular formation and cortical neurons. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. (1983a) 55: 301-313.

-Faingold, C. L., Hoffman, W. E. & Caspary, D. M., On the site of pentilentetrazol-induced enhancement of auditory responses of the reticular formation: Localized cooling and electrical stimulation studies. Neuropharmacology. (1983b) 22: 961-970.

-Faingold, C. L., The role of the brain stem in generalized epileptic seizures. (1987) Eur. J. Pediat. 2: 81-112.

-Faingold, C. L. & Browning, R. A., Mechanisms of anticonvulsant drug action. I. Drugs primarily used for generalized tonic-clonic and partial epilepsies. Eur. J. Pediat. (1987a) 146: 2-7.

- Faingold, C. L. & Browning, R. A., Mechanisms of anticonvulsant drug action. II. Drugs primarily used for absence epilepsy. *Eur. J. Pediatr.* (1987b) 146: 8-14.
- Faingold, C. L., Millan, M. H., Boersma, C. A., & Meldrum, B. S., Excitant amino acids and audiogenic seizures in the genetically epilepsy-prone rat. I. Afferent seizure initiation pathway, *Exp. Neurol.*, (1988) 99: 678-686.
- Firemark, Barlow, C. F. & Roth, L. J., The entry, accumulation and binding of diphenylhydantoin-2-c<sup>14</sup> in brain. Studies on adult, immature and hypercapnic cats, *Int. J. Neuropharmac.*, (1963) 2: 25-28.
- Fisher, R. S., Animal models of the epilepsies, *Brain, Research Reviews*, (1989) 14: 245-278.
- Fontana, A., IgA deficiency, epilepsy, and hydantoin medication. *Lancet*, (1976) 2: 228-230.
- Freedman, D. A. & Ferriss, G. S., Effect of mesencephalic lesions on metrazol-induced cortical activity. *Neurology.* (1956) 6: 173-178.
- Frey, H. H., (1985). Primidone. In: H. H. Frey and D. Janz (Eds.), *Antiepileptic drugs. Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 74, Springer-Verlag, Berlin, pp. 447-449.
- Fritsch, G. H. & Hitzig, E., Ueber die elektrische erregbarkeit der grosshirns, *Arch. Anat. Physiol. Wissensch. Med.*, (1972) 37: 300.
- Fromm, G. H., Differential effect of antiepileptic and non-antiepileptic drugs on the reticular formation. *Life Sci.* (1984) 35: 2665-2673.
- Fromm, G. H., Effects of different classes of antiepileptic drugs on brain-stem pathways. *Fed. Proc.* (1985) 44: 2432-2435.
- Fromm G. H., Faingold, C. L., Browning, R. A. & Burnham, W. M., (1987). Epilepsy and the reticular formation: the role of reticular core in convulsive seizures, Liss, New York, pp. 1-224.
- Fromm, G. H. & Terrence, C. F., (1987). Effect of antiepileptic drugs on the brain-stem. In Fromm, G. H., Faingold, C. L., Browning, R. A., and Burnham, W. M, (Eds.). *Epilepsy and the Reticular Formation: The Role of the Reticular Core in convulsive Seizures*, Liss, New York, pp. 119-136.
- Gage, P. W., Presynaptic and postsynaptic depressant effects of phenytoin sodium at the neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* (1980) 69: 119-121.

- Galbraith, R. & Michanovicz, J., The effects of cimetidine on the oxidative metabolism of estradiol. *N Eng. J. Med.* (1989) 321: 269-279.
- Gale, K. & Iadarola, M., Drug –induced elevation of GABA after intracerebral microinjection: Site of anticonvulsant action. *Eur. J. Pharmacol.* (1980) 68: 233-235.
- Gale, K., Mechanisms of seizure control mediated by GABA: role of the substantia nigra. *Fed. Proc.* (1985) 44: 2414-2424.
- Gale, K. (1986). Role of the substantia nigra in GABA-mediated anticonvulsant actions. In Delgado, Escuata, A. V., Ward, A. A., Jr., Woodbury, D. M. & Porter, R. J., (eds.), *Basic Mechanisms of the Epilepsies (Advances in Neurology, Vol. 44)*, Raven Press, New York, pp. 343-364.
- Gallagher, B. B., (1976). Adrenal hyperplasia in epileptic patients. In: *Quantitative analytic studies in epilepsy*, Edited by P. Kellaway and Petersen. Raven Press, New York.
- Garant, D. S. & Gale, K., Lesions of substantia nigra protect against experimentally induced seizures. *Brain Res.* (1983) 273: 156-161.
- Gastaut, H. (1969). Introduction to the study of generalized epilepsies. In Gastaut, H., Jasper, H., Bancaud, J., and Waltrgny, A. (Eds.), *the Physiopathogenesis of the Epilepsies*. Thomas, Springfield, Ill., pp xi- xvii.
- Gately, L. E. & Lam, M. A., Phenytoin-induced epidermal necrolysis. *Ann. Int. Med.*, (1979) 91: 59-60.
- Gerhard, H. F., (1987). *Epilepsy and the reticular formation. The role of the reticular core in convulsive seizures*. Alan, R. Liss, Inc., New York. 224 pp.
- Gioanni, Y., Seizures can be triggered by stimulating non-cortical structures in the quaking mutant mouse. *Epilepsy Res.*, (1991) 9: 19-31.
- Gladding, G. D. & Kupfeberg, H. J., (1985). Antiepileptic drug development program. In: H. H. Frey and D. Janz (Eds.). *Antiepileptic Drugs. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 74, Springer Berlin. Pp. 341-347.
- Gloor, P., Generalized cortico-reticular epilepsies. Some considerations of the pathophysiology of generalized bilaterally synchronous spike and wave discharge. *Epilepsia*. (1968) 9: 249-263.
- Goldberg, M. A. & Todoroff, T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1976) 196: 579-585.
- Goldberg, M. A., Phenytoin, phospholipids and calcium. *Neurology*, (1977) 27: 827-833.

- Gropper, A. L., Diphenylhydantoin sensitivity. Report of fatal case with hepatitis and exfoliative dermatitis. *N Eng. J. Med.*, (1956) 254: 522-523.
- Guyton, C. A., 1978. *Anatomía y fisiología del sistema nervioso*. Ed. Interamericana, México. pp. 136-137.
- Hansen, J. M., Kristiansen, M., Skovsted, L. & Christensen, L. K., Dicumarol-induced diphenylhydantoin intoxication, *Lancet*. (1966) 265-266.
- Harbaugh, R. E. & Wilson, D. H., Telencephalic theory of generalized epilepsy: Observations in split-brain patients. *Neurosurgery*. (1982) 10: 725-732.
- Hershkowitz, N., Ayala, G. F., Effects of phenytoin on pyramidal neurons of the rat hippocampus. *Brain Res*. (1981) 208: 487-492.
- Herzog, A. G., Phenytoin-Induced Elevation of Serum Estradiol and Reproductive Dysfunction in Men with Epilepsy. *Epilepsia*, (1991) 32 (4): 550-553.
- Huxtable, R. & Laird, H., The prolonged anticonvulsant action of taurine on genetically determined seizure-susceptibility, *Can. J. Neurol. Sci.*, (1978) 5: 215-221.
- Iadarola, M. J. & Gale, K., Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by  $\lambda$ -aminobutyric acid. *Science*. (1982) 218: 1237-1240.
- Janz, D. & Schmidt, D., Antiepileptika unter die sicherheit oraler kontrazeptiva. *Bibl. Psychiat*. (1975) 151: 82-85.
- Jinnai, D., Mogami, H., Mukawa, J., Iwata, Y. & Kobayashi, K., Effect of brain-stem lesions on metrazol-induced seizures in cats. *S. Electroenceph. Clin. Neurophysiol*. (1969) 27: 404-411.
- Jolly, E. R. & Steinhaus, J. E., The effect of drugs injected in to limited portions of the cerebral circulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. (1956) 116: 273-281.
- Jones, G. L., (1985). *Antiepileptic drugs*. New Cork, Springer-Verlag, pp. 351-419.
- Katarzyna, M. B., Rafal, M. K. & Stanislaw, J. C., Influence of the antagonist of the glycine site of NMDA receptors, MRZ 2/576, on the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs in mice. *Pharmacological Reports* (2005) 57: 458-466.
- Katz, B., *The release of neural transmitter substances*. Springfield, I. L., Thomas, (1969).

- Kiorboe, E., Phenytoin intoxication during treatment with antabuse (R) (Disulfram), *Epilepsia*, (Amst.), (1966) 7: 246-249.
- Kiorboe, E. & Plum, C. M., Megaloblastic anemia developing during treatment of epilepsy. *Acta Med. Scand.*, (Suppl), (1966) 445: 349-357.
- Koella, W. P., (1985). Animal experimental methods in the study of antiepileptic drugs. *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 74, Springer-Verlag, Berlin, pp. 283-339.
- Kokenge, R., Kurtt, H. & McDowell, F. M., Neurological sequelae following Dilantin overdose in patient in experimental animals. *Neurology*, (1965) 15: 823-829.
- Korey, S. R., Effect of dilantin and mesantoin on the giant axon of the squid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1951) 76: 297-299.
- Krall, R. L., Penry, J. K., White, B. G., Kupfelberg, H. J. & Swinyard, E. A., Antiepileptic drug development. II. Anticonvulsant drug screening, *Epilepsia*, (1978) 19: 409-428.
- Kreindler, A., Zuckermann, E., Steriade, M. & Chimion, D., Electroclinical features of convulsions induced by stimulation of brain stem, *J. Neurophysiol.*, (1958) 21: 430-436.
- Kruse, R., Osteopathien bei antiepileptischer lanzeittherapie. *M Schr. Kinderheilk.* (1968) 116: 378-381.
- Kudo, M., Itoh, K., Kawamura, S. & Mizuno, N., Direct projections to the pretectum and the midbrain reticular formation from auditory relay nuclei in the lower brainstem of the cat. *Brain Res.* (1983) 288: 13-19.
- Kupfelberg, H. J., Antiepileptic drug development program: a cooperative effort of government and industry, *Epilepsia*, 30, Suppl. (1989) 1: S51-S56.
- Kusske, J. A., Effects of lesions in ventral anterior thalamus on experimental focal epilepsy. *Exp. Neurol.* (1972) 34: 279-290.
- Lalonde, R., Dopaminergic super sensitivity after long term administration of phenytoin in rats, *Epilepsia*. (1985) 26: 81-84.
- Latorre, H. & Kenny, F. M., High-dosage intravenous calcium therapy for osteoporosis and osteomalacia in anticonvulsant therapy by with hipomobilization. *Pediatrics*, (1974) 53: 100-105.

- Lauting, A., Extrapyrimalid syndrome with sodium valproate. *Br. Med. J.*, (1979) 2: 1035-1036.
- Lawrence, E. H., Pansky, B. & Siegel, A., (1982). *Neurociencia*. Ed. McGraw-Hill, México. pp. 557.
- Lee, T. J., Diphenylhydantoin-induced hepatic necrosis. *Gastroenterology*, (1976) 70: 422-424.
- Le Gal La Salle., Abortive amygdaloid kindled seizures following microinjection of gamma-vinyl-GABA in the vicinity of substantia nigra in rats. *Neurosci. Lett.*, (1983) 36: 69-74.
- Lepore, R., Dopaminergic action of diphenylhydantoin in rat striatum: Effect on homobanillic acid cyclic AMP levels, *Psychopharmacology (Berl.)*, (1985) 86: 27-30.
- Lipicky, R. J., Diphenylhydantoin inhibition of sodium conductance in squid giant axon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (1972) 69: 1758-1760.
- Litchfield, J. T. & Wilcoxon, F. A., Simplified method of evaluating dose- effect experiments, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1949) 96: 99-113.
- Löscher, W., Comparative assay of anticonvulsant and toxic potencies of sixteen GABA-mimetic drugs, *Neuropharmacology*, (1982) 21: 803-810.
- Löscher, W., (1985). GABA-mimetics in animal models of seizure states. In: G. Bartholini, L. Bossi, K. G. Lloyd & P. L. Morselli (Eds.), *Epilepsy and GABA receptor agonists. Basic and therapeutic research*, Raven press, New York, pp. 109-119.
- Löscher, W. & Schmidt, D., Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res.*, (1988) 2: 145-181.
- Löscher, W., Fassbender, C. P. & Nolting, B., The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. II. Maximal electroshock seizure models, *Epilepsy Res.*, (1991a) 8: 79-94.
- Löscher, W., Fassbender, C. P. & Nolting, B., The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models. *Epilepsy Res.*, (1991b) 8: 171-189.
- Löscher, W. & Björn, N., The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. IV. Protective indices, *Epilepsy Res.*, (1991) 9: 1-10.

- Löscher, W. & Schmidt, D., New horizons in the development of antiepileptic drugs. *Epilepsy Res.*, (2002) 50: 3-16.
- Lothman, E. W., Intraperitoneal phenytoin suppresses kindled responses: Effects on motor and electrographic seizures. *Epilepsy Res.*, (1991) 9: 11-18.
- Macdonald, L. R., *Advances in Neurology*. Edited by A. V. Delgado Escueta, A. A. Ward. Jr., D. M Woodbury, and R. J. Porter. Raven Press. New York. (1986) 44: 713-736.
- Macdonald, L. R., (1991). *Epilepsia Experimental*. Eds. S. Brailowsky, E. Otero-Siliceo. México, 295 pp.
- Magoun, H. W. & Rhines, R. J. *Neurophysiol*, (1946) 9: 165-171.
- Marcus, E. M., (1972). Experimental models of petit mal epilepsy. In: *Experimental Models of Epilepsy*, Edited by D. P. Purpura, J. K. Penry, D. M. Woodbury and R. D. Walter, Raven Press, New York, pp. 113-146.
- Marrosu, F., Failure of acute diphenylhydantoin to affect the spontaneous electrical activity of dopamine cells. *Epilepsy Res.*, (1990) 6: 205-210.
- Marsan, C. A., (1972). Focal electrical stimulation. In: D. P. Purpura, *Experimental models of epilepsy, a manual for the laboratory worker*. Raven Press, New York. pp. 147-172.
- Martín, E. D. & Pozo, M. A., Animal models for the development of new neuropharmacological therapeutics in the status epilepticus. *Current Neuropharmacology* (2006). 4, 33-40.
- Martínez, D., (1991). *Epilepsia experimental*. Eds. S. Brailowsky, E. Otero-Siliceo. México, 295 pp.
- Matsuki, N., Sodium channel blocking action of phenytoin in mammalian neurons in tissue cultures. *Soc. Neurosci. Abstr.* (1981) 7: 811.
- Matthews, W. D. & Connor, J. D., Actions of iontophoretic phenytoin and medazepan on hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1977) 201: 613-621.
- Mayanagi, Y. & Walker, A. E., Experimental temporal lobe epilepsy. *Brain*, (1974) 97: 423-446.
- Maynert, E. W., The role of biochemical and neurohormonal factors in the laboratory evaluation of antiepileptic drugs, *Epilepsia*, (1969) 10: 145-162.

-McInnes, G. T. & Brodie, M. J., Drug interactions that matter-a critical reappraisal, *Drugs*, (1988) 36: 83-110.

-McLean, M. J. & McDonald, R. L., Phenytoin effects on action potentials of fetal mouse spinal cord neurons in cell culture. *Soc. Neurosci. Abstr.* (1981) 7: 629.

-McLean, M. J. & McDonald, R. L., Multiple actions of phenytoin on mouse spinal cord neurons in cell culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1983) 227: 779-789.

-McNamara, J. O., Evidence that substantia nigra is crucial to neural network of kindled seizures. *Eur. J. Pharmacol.*, (1983) 86: 485-486.

-Meikle, A. W., Effect of diphenylhydantoin on the metabolism of metapyrone and release of ATCH in man. *J. Clin. Endocrinol.*, (1969) 29 1553-1558.

-Meldrum, B. S. & Rogawski, M. A., Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics*. (2007) January; 4 (1): 18-61.

-Merritt, H. H. & Putnam, T. J., A new series of anticonvulsant drugs tested by experiments on animals. *Arch. Neurol. Psychiatry.* (1938) 39: 1003-1015.

-Miller, J. W. & Ferrendelli, J. A., The central medial nucleus: thalamic site of seizure regulation, *Brain Res.*, (1990) 508: 297-300.

-Mirski, M. A. & Ferrendelli, J. A., Interruption of the mammillothalamic tract prevent seizures in guinea pigs. *Science*, (1984) 226: 72-74.

-Moruzzi, G. & Mogoun, H. W., Brain Stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* (1949) 1: 455-473.

-Mosekilde, L. & Melsen, F., Anticonvulsant osteomalacia determined by quantitative analysis of bone changes. Population study and possible risk factors. *Acta med. Scand.*, (1976) 199: 349-355.

-Mueller, K., Erythema exudativum multiforme majus (Stevens-Johnson syndrome) infolge suxinutin-ueberempfindlichkeit. *Z. Kinderheilk.* (1963) 88: 548-563.

-Mullan, S., Thalamic lesions for the control of epilepsy. A study of nine cases. *Arch. Neurol. (Chic).* (1967) 16: 277-285.

-Naquet, R. & Meldrum, B. S., (1972). Photogenic seizures in baboons. In: *Experimental Models of Epilepsy*, Edited by Purpura, J. K. Penry, D. M. Woodbury and R. D. Walker, Raven Press, New York, pp. 373-406.



-Nolte, R., (1980). Effects of phenytoin-and primidone-monotherapy on mental performance in children. In: antiepileptic therapy: Advances in Drug Monitoring, Edited by S. I. Johannessen, P. L. Morselli, C. E. Pippenger, A. Richens. Raven Press, New York.

-Olsen, R. W., The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex. Site of action of convulsant and anticonvulsant drugs. *Molec. Cell Biochem.* (1981) 39: 261-279.

-Olsen, R. W., Role of the gamma-aminobutyric acid receptor-ionophore complex in seizure disorders. *Ann. Neurol.* (1984) 16: 590-597.

-Penfield, W. & Jasper, H. H., (1954). *Epilepsy and the functional anatomy of the human brain*, Little Brown, Boston, pp. 713.

-Perry, J. G., The cellular mode of action of the antiepileptic drug 5,5-Diphenylhydantoin. *Nature. (Lond.)*, (1978) 272: 271-273.

-Peterson, S. L. & Albertson, T. E., (1998). *Neuropharmacology methods in epilepsy research*. CRC Press methods in the life sciences. Florida. pp. 282.

-Pincus, J. H., Diphenylhydantoin and ion flux in lobster nerve. *Arch. Neurol.* (1972) 26: 4-10.

Pincus, J. H. & Lee, S. H., Diphenylhydantoin and calcium: relation to norepinephrine release from brain slices. *Arch. Neurol.* (1973) 29: 239-244.

-Pollack, M. A., Mucocutaneous eruptions due to antiepileptic drug therapy in children. *Ann. Neurol.*, (1979) 5: 262-267.

-Pórszász, J. & Wórum, I., Seasonal variations of electroshock seizure susceptibility in the rat, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, (1971) 40: 93-100.

-Porter, J. R., (1983). *Epilepsy*, Edited by A. A. Ward, Jr., J. K. Penry, & D. Purpura. Raven Press, New York. pp. 225-237.

-Porter, R. J., Cereghino, J. J., Gladding, G. D., Hessie, B. J., Kupferberg, H. J., Scoville, G. & White, B. G., Antiepileptic drug development program, *Cleve. Clin. Quart.*, (1984) 51: 293-305.

-Powis, D. A., Does Na. K-ATPase play a role in the regulation of neurotransmitter release by presynaptic  $\alpha$ -adrenoseptors?. *Biochem. Pharmacol.* (1981) 30: 2389-2397.

-Prince, D. A., (1972). Topical convulsants drugs and metabolic antagonists. In: *Experimental Models of Epilepsy*, Edited by Purpura, J. K. Penry, D. M. Woodbury & R. D. Walter, Raven Press, New York, pp. 51-83.

- Puro, D. G. & Woodward, D. J., Effects of diphenylhydantoin on activity of rat cerebellar Purkinje cells, *Neuropharmacology* (1973) 433-440.
- Purpura, D. P., (1972). Ontogenetic models in studies of cortical seizure activity. In: *Experimental Models of Epilepsy*, Edited by Purpura, J. K. Penry, D. M. Woodbury and R. D. Walter, Raven Press, New York, pp. 531-556.
- Raines, A. & Anderson, J. R., Effects of acute cerebellectomy on maximal electroshock seizures and anticonvulsant efficacy of diazepam in the rat. *Epilepsia*, (1976) 17: 177-182.
- Rall, T. W., (1980). Drugs effective in therapy of the epilepsias. In Gilman A. G., Goodman L. S., Gilman A. (Eds.): *The pharmacological basis of therapeutics*. 6th ed. New York, Macmillan pp. 448-474.
- Ralston, B. L. & Langer, II., Experimental epilepsy of brainstem origin. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* (1965) 18: 325-333.
- Rapport, R. L., Harris, A. B., Friel, P. N. & Ojemann, G. A., *Arch. Neurol.*, (1975) 32: 549-585.
- Rasmussen, S. & Kristensen, M., Choreo-athetosis during phenytoin treatment. *Acta Med. Scand.* (1977) 201: 239-241.
- Rawlins, M. D., Adverse reactions to drugs. *Br. Med. J.*, (1982) 282 (1): 974-976.
- Research Biochemicals Incorporated, (1991). *Neurochemicals for the Neuroscientist*. R. B. I., U. S. A. pp. 67.
- Roberts, D. L. & Marks, R., Skin reactions to carbamazepine. *Arch. Dermat.*, (1981) 117: 273-275.
- Rogawski, M. A., Molecular Targets Versus Models for New Antiepileptic Drug Discovery. *Epilepsy Res.* (2006) January; 68(1): 22-28.
- Rosenberg, P. P. Drug effects on the spontaneous electrical activity of the squid giant axon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1967) 155: 532-544.
- Rowe, D. J. F., Alkaline phosphatase levels in epileptic subjects. *Br. Med. J.*, (1974) 3: 686.
- Ruch, C. T., Patton, H. D., Woodbury, J. W. & Towe, A. L., (1974). *Neurofisiología*. Eds. Libreros López, Buenos Aires. pp. 218-222.

- Sander, JWAS., & Shovron, SD., (1996). Epidemiology of the epilepsies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 61: 433-443.
- Schmidt, D., (1981). The effects of anticonvulsant drug on estrogen and progesterone metabolism in oral contraception. In: proceedings 12th epilepsy international symposium, Raven Press, New York.
- Schmidt, D., (1982). Adverse effects of antiepileptic drugs. Raven Press, New York.
- Schmidt, D. & Morselli, P. L. (Eds.). (1986). *Intractable Epilepsy: Experimental and Clinical Aspects*, Raven Press. New York.
- Schmidt, D. & Lempert, T., (1987). Advances in epileptology. Phenytoin toxicity: relation to plasma concentration. Edited by P. Wolf, M. Dam, D. Janz, F. E. Dreifuss. Raven Press, New York. pp. 449-452.
- Schneider, J. S., Manetto, C. & Lidsky, T. I., Substantia nigra projection to medulary reticular formation: Relevant to oculomotor and related motor functions in the cat. *Neurosci. Lett.* (1985) 62:1-6.
- Shimoji, K Fujioka, H., Fukazawa, T., Hashiba, M. & Murayama, Y., Anesthetics and excitatory/inhibitory responses of midbrain reticular neurons. *Anesthesiology* (1984) 61: 151-155.
- Sidman, R. L., Antevine, J. B. & Pierce, E. T., (1971). *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord*, Harvard University Press, Cambridge, MA, 185 pp.
- Sironi, V. A., Antiepileptic drug distribution in cerebral cortex, Amon's Horn, and Amygdala. *J. J. Neurosurg.* (1980) 52: 686-692.
- Skya, J. J., Popelar, J. & Radil-Wiess, T., Influence of increasing doses of pentobarbital on the mesencephalic reticular formation in rats. Spontaneous firing of neural pairs and activity evoked by polarization. *Brain Res.* (1975) 88: 263-279.
- Snider, R. S. & Del Cerro, M., (1972). Diphenylhydantoin: proliferating membranes in cerebellums resulting from intoxication. In: *Antiepileptic drugs*, Woodbury, D. M., Penry, J. K., and Schmidt, R. P., (Eds.), Raven Press, New York, pp. 237-245.
- Spiegel, E. A., Quantitative determination of the convulsive reactivity by electrical stimulation of the brain with the skull intact, *J. Lab. Clin. Med.*, (1937) 22: 1274-1276.
- Sprague, J. M. & Chambers, W. W., *AMER. J. Physiol.*, (1954) 176: 52-64.

- Stagnitto, L. M., Preclinical profile of remacemide: a novel anticonvulsant effective against maximal electroshock seizures in mice. *Epilepsy Res.*, (1990) 7: 11-28.
- Stahl, L. W. & Harris, E. W., *Advances in Neurology*, cap. 34. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. Edited by A. V. Delgado-Escueta, A. A. Ward. Jr. Raven Press, New York, (1986) 44: 681-693.
- Stores, G., Behavioral effect of anticonvulsant drugs. *Dev. Med. Child. Neurol.*, (1975) 17: 647-658.
- Sugaya, E., (1987). *Advances in epileptology. Phenytoin effects on pentylenetetrazole-induced intracellular calcium related abnormal phenomena.* Edited by P. Wolf, M. Dam, D. Janz, F. E. Dreifuss. Raven Press, New York. pp. 507-510.
- Swinyard, E. A., Laboratory assay of clinically effective antiepileptic drugs, *J. Am. Pharm. Ass.*, (1949) 38: 201-204.
- Swinyard, E. A., Brown, W. C. & Goodman, L. S., Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats, *Pharmacol. Exp. Ther.*, (1952) 106: 319-330.
- Swinyard, E. A., Laboratory evaluation of antiepileptic drugs. Review of laboratory methods, *Epilepsia*, (1969) 10: 107-119.
- Swinyard, E. A., (1972). *Electrically induced convulsions*, Raven Press, New York, pp. 433-458.
- Swinyard, E. A. & Woodehad, J. H., (1982). Experimental detection, quantification and evaluation of convulsants. In: D. M. Woodbury, J. K. Penry, and C. E. Pippenger (Eds.), *Antiepileptic drugs*, Raven Press, New York, pp. 111-126.
- Taafe, A. & O'Brien, C., A case of Stevens-Johnson syndrome associate with the anticonvulsants sulthiame and ethosuximide. *Br. Dent. J.* (1975) 138: 172-174.
- Teoh, P. C. & Chan, H. L., Lupus-scleroderma syndrome induced by ethosuximide, *Arch. Dis. Child.* (1975) 50: 658-661.
- Thompson, P. J., Phenytoin and cognitive functions: Effects on normal volunteers and implications for epilepsy. *Br. J. Clin. Psychol.* (1981) 20: 155-162.
- Toman, J. E. P., *The neuropharmacology of antiepileptic drugs.* *EEG Clin. Neurophysiol.* (1949) 1: 33-44.

- Tower, D. B., (1969). Neurochemical mechanisms. In: Basic mechanisms of the epilepsias, Edited by H. H. Jasper, A. A. Ward, Jr., and A. Pope, Little Brown, New York. pp. 611-646.
- Tuttle, J. B. & Richelson, E., Phenytoin action on the excitable membrane of mouse neuroblastoma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1979) 211: 632-637.
- Van Straaten, J. J., Abolition of electrically induced cortical seizures by stereotaxic thalamic lesions: Evidence for descending thalamopontine medullar spinal connections in the centrencephalic epileptic system of the cat. *Neurology (Mineap.)*. (1975) 25: 141-149.
- Vallarta, J. M., A progressive encephalopathy due to chronic hydantoin intoxication. *Am. J. Dis. Child.* (1974) 128: 27-34.
- Vincent, F. M., Phenytoin/dexametason interaction. *Lancet*, (1978) 1: 1360.
- Vizi, E. S., Sodium-potassium activated adenosinetriphosphatase as a trigger in transmitter release. *Neuroscience*. (1978) 3: 367-384.
- Wada, J. A., Pharmacological prophylaxis in the kindling model of epilepsy, *Arch. Neurol.*, (1977) 34: 389-395.
- Walker, E. A. (1983). Epilepsy. The past four decades of experimental epilepsy. Edited by A. A. Ward, Jr., J. K. Penry & D. Purpura. Raven Press, New York. pp. 1-17.
- Waszczak, B. L., Eng, N. & Walters, J. R., Effects of muscimol and picotroxin on single unit activity of substantia nigra neurons. *Brain Res.* (1980) 188: 185-197.
- Waszczak, B. L., Bergstrom, D. A. & Walters, J. R. (1981). Single unit responses of substantia nigra and globus pallidus neurons to GABA agonist and antagonist drugs. In Di Chara, G. & Gessa, D. L. (Eds.), *GABA and the Basal Ganglio*, Raven Press, New York, pp. 79-94.
- Weedon, A. P., Diphenylhydantoin sensitivity. A syndrome resembling infectious mononucleosis with a morbilliform rash and cholestatic hepatitis. *Aust. NZJ. Med.* (1975) 5: 561-563.
- Woodbury, D. M. & Davenport, V. D., Design and use of a new electroshock seizure apparatus, and analysis of factors altering seizure threshold and pattern, *Arc. Int. Pharmacodyn. Ther.*, (1952) 92: 97-107.

- Woodbury, D. M., Effect of diphenylhydantoin on electrolytes and radiosodium turnover in brain and other tissues of normal, Hyponatremic and Postictal rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1955) 115: 74-95.
- Woodbury, D. M., Role of pharmacological factors in the evaluation of anticonvulsant drugs, *Epilepsia*, (1969) 10: 121-144.
- Woodbury, D. M., (1972). Applications to drug evaluations. In: D. P. Purpura, J. K. Penry D. Toser, D. M. Woodbury and R. Walter (Eds.), *Experimental models of epilepsy, a manual for the laboratory worker*, Raven Press. New York, pp. 557-583.
- Woodbury, D. M., (1980) Phenytoin: introduction and history. In: *Antiepileptic Drugs: Mechanisms of action*, Edited by G. H. Glaser, J. K. Penry, & D. M. Woodbury, Raven Press, New York, pp. 305-313.
- Woodbury, D. M., (1982). *Antiepileptic drugs*: Woodbury, D. M., Penry, J. K., Pippenger, C. E., (Eds.), Raven Press, New York, pp. 191-207.
- Woodbury, D. M., (1983). *Epilepsy*, edited by A. A. Ward, Jr, J. K. Penry, and D. Purpura. Raven Press, New York. Pp. 179-223.
- Woodruff, M. L., Changes in focal epileptic activity produced by brain-stem sections in the rabbit. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* (1973) 35: 475-486.
- Worms, P. & Lloyd, K. G., (1981). Functional alterations of GABA synapse in relation to seizures. In: P. L. Morselli, (Eds.), *Neurotransmitters, seizures and epilepsy*, Raven Press, New York, pp. 37-48.
- Wroblenski, B. A., McColgan, K., Smith, K., Whyte, J. & Singer, W. D., The incidence of seizures tricyclic antidepressant drug treatment on a brain injured population. *J. Clin. Psychopharmacol.* (1990) 10: 124-128.
- Yaari, Y., Depression of synaptic transmission by diphenylhydantoin. *Ann. Neurol.* (1977) 1: 334-338.
- Yaari, Y., Phenytoin and transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *Brain Res.* (1979) 160: 479-487.
- Yaari, Y., Frequency-dependent effects of phenytoin on frog junctional transmission: presynaptic mechanisms. *Brain. Res.* (1985) 345: 102-110.
- Yaari, Y., Phenytoin: Mechanisms of its Anticonvulsant Action. *Ann. Neurol.*, (1986) 20: 171-184.

-Zhang, H., Anticonvulsant actions and interaction of GABA agonists and benzodiazepine in pars reticulata of substantia nigra. *Epilepsy Res.*, (1991) 8: 11-20.