

2 ej 76

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**'ACTIVIDAD EPILEPTICA INDUCIDA POR LA ADMINISTRACION
INTRAHIPOCAMPICA E INTRAPERITONEAL DE 4-AMINOPIRIDINA
Y SU MODIFICACION POR NIFEDIPINA'**

**TRABAJO DE TESIS QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE BIOLOGO PRESENTA**

JORGE LUCIO FRAGOSO VELOZ

MEXICO, D.F., JUNIO DE 1989.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

página

I. RESUMEN	10
II. PREFACIO	11
III. INTRODUCCION	
A. GENERALIDADES	
1. Importancia de la comunicación intercelular	13
2. Modos de comunicación intercelular	13
3. Bases morfológicas de la transmisión sináptica ..	14
4. Bases moleculares de la transmisión sináptica	
a) Importancia del calcio en los sistemas biológicos	17
b) Mecanismo de liberación de transmisores e importancia del calcio en este proceso	18
B. LA 4-AMINOPIRIDINA	
1. Generalidades. Características físicas y químicas	21
2. Farmacocinética y metabolismo	21
3. Usos y aplicaciones clínicas	24
4. Efectos <i>in vitro</i>	25
5. Efectos <i>in vivo</i>	27
6. Mecanismo de acción	28
a) Evidencias de su papel como bloqueador de los canales de potasio	29
b) Evidencias de un efecto directo sobre los canales de calcio sensibles a voltaje	30
C. LAS DIHIDROPYRIDINAS	
1. Generalidades. Características físicas y químicas	32

El presente trabajo es el resultado de una investigación realizada en el laboratorio de Neurofisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, durante el año 1968. Se agradece a los señores profesores de Fisiología y Farmacología, especialmente al profesor Dr. Carlos Valdovinos, por su orientación y colaboración durante el desarrollo de este trabajo. Se agradece también a los señores profesores de Fisiología y Farmacología, especialmente al profesor Dr. Carlos Valdovinos, por su orientación y colaboración durante el desarrollo de este trabajo.

El presente trabajo es el resultado de una investigación realizada en el laboratorio de Neurofisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, durante el año 1968. Se agradece a los señores profesores de Fisiología y Farmacología, especialmente al profesor Dr. Carlos Valdovinos, por su orientación y colaboración durante el desarrollo de este trabajo. Se agradece también a los señores profesores de Fisiología y Farmacología, especialmente al profesor Dr. Carlos Valdovinos, por su orientación y colaboración durante el desarrollo de este trabajo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales y métodos de la investigación

2. Materiales y métodos de la investigación

3. Materiales y métodos de la investigación

4. Materiales y métodos de la investigación

IV. RESULTADOS

1. Resultados de la investigación

2. Resultados de la investigación

3. Resultados de la investigación

4. Resultados de la investigación

5. Resultados de la investigación

6. Resultados de la investigación

7. Resultados de la investigación

8. Resultados de la investigación

VI. RESULTADOS

1. Alteraciones motoras inducidas por la administración intrahipocámpica de la 4-amino-piridina

2. Efecto de la nifedipina sobre las sacudidas de perro mojado provocadas por la inyección intrahipocámpica de la 4-aminopiridina	58
3. Actividad eléctrica epileptiforme asociada con las convulsiones limbricas y las sacudidas de perro mojado	58
4. Modificaciones por la nifedipina de la actividad epileptiforme generada por la administración intrahipocámpica de la 4-aminopiridina	61
5. Patrón convulsivo inducido por la administración intraperitoneal de la 4-aminopiridina	66
6. Efecto de la nifedipina sobre el patrón convulsivo inducido por la aplicación intraperitoneal de la 4-aminopiridina	66
7. Actividad eléctrica epileptiforme asociada a las convulsiones tónico generalizadas	68
8. Efecto de la nifedipina sobre la actividad eléctrica asociada a las convulsiones tónico generalizadas	72

VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES

1. Convulsiones limbricas y tónico generalizadas inducidas por la administración intrahipocámpica o intraperitoneal de la 4-aminopiridina	73
2. Potenciación por la nifedipina de las convulsiones tónico generalizadas	76
3. Sacudidas de perro mojado provocadas por la aplicación intrahipocámpica de la 4-aminopiridina	78
4. Inducción de actividad eléctrica epileptiforme	80

VIII. REFERENCIAS	83
-------------------------	----

Los mecanismos moleculares que, a nivel neuronal, dan base al desarrollo de la epileptogénesis son en gran parte desconocidos. Uno de los enfoques para estudiar la epilepsia es el modelo experimental con la 4-aminopiridina. Se sabe que esta droga produce convulsiones en una amplia variedad de especies animales, sin embargo su mecanismo de acción aún no está bien entendido. La 4-AP se ha usado ampliamente como un bloqueador de los canales de potasio, pero también hay evidencias de que está afectando directamente a los canales de calcio sensibles a voltaje, provocando con ello la generación de corrientes de calcio, un catión que tiene un papel crucial en la generación de crisis epileptogénicas y en la acción de drogas convulsivas y anticonvulsivas.

El presente trabajo estuvo encaminado a tratar de dilucidar el mecanismo de acción de la 4-AP, para ello caracterizamos los patrones conductuales y electroencefalográficos de la actividad epiléptica inducida al administrar esta droga por vía intrahipocámpica e intraperitoneal. En otro enfoque experimental, probamos a la nifedipina, una dihidropiridina antagonista de los canales de calcio sensibles a voltaje, como posible antagonista de los efectos de la 4-AP. Los resultados muestran una potenciación paradójica de los patrones epilépticos inducidos por la 4-AP.

Al surgir los primeros organismos unicelulares e ir evolucionando, eventualmente surgen organismos de una complejidad cada vez mayor hasta culminar con los organismos pluricelulares. Así, los mecanismos evolutivos han dado lugar a un sinnúmero de especies cuya diversidad abarca desde seres procariontes a eucariontes, de autótrofos a heterótrofos, desde plantas a animales y desde unicelulares hasta multicelulares. Esta última diferencia da pie a toda una serie de especulaciones e investigaciones en torno a la complejidad celular, morfológica y fisiológica que caracteriza a los organismos pluricelulares. A lo largo del tiempo geológico, los organismos con determinadas características que les permitieron optimizar al máximo sus procesos fisiológicos, pudieron verse favorecidos por la selección natural. Entre estas características, la comunicación entre las células constituyó un mecanismo crucial para la supervivencia de cualquier ser vivo multicelular. De esta manera, todas las especies que observamos en la actualidad, incluida la nuestra, son las que han logrado sobrevivir, hasta ahora, gracias a que poseemos los mecanismos que nos hacen estar entre los más aptos y mejor adaptados al medio ambiente.

Por todo lo anterior, es de importancia crucial para el biólogo tratar de esclarecer y entender, desde un punto de vista fisiológico pero también evolutivo, las características que nos han permitido sobrevivir como especie. Es bien sabido que muchos organismos unicelulares comparten con los vertebrados toda una serie de moléculas químicas que, sin embargo, son utilizadas en

Procesos distintos y a través de mecanismos diferentes. Así, se sabe que algunos peces, al igual que el hombre, poseen la hormona prolactina, o que organismos unicelulares poseen catecolaminas, serotonina y acetilcolina (Roth et al. 1982) y que los paramecios presentan corrientes iónicas similares a las de las células nerviosas (Hinrichsen y Schultz, 1988). Además, organismos como los erizos de mar poseen moléculas como la noradrenalina, la dopamina, la serotonina y la acetilcolina (Schmitt, 1984). Tomando como modelos a estos organismos, y a otros más cercanos al hombre en la escala filogenética, tales como los roedores, debemos tratar de dilucidar, cada vez con mayor detalle, los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que operan en los organismos multicelulares para mantener una armonía celular y una integridad bien definida, así como tratar de esclarecer las ramas filogenéticas por las cuales estos mecanismos han evolucionado.

1. Importancia de la comunicación intercelular.

Tomando en consideración la importancia adaptativa y evolutiva que constituye la comunicación intercelular, queda claro que para los organismos multicelulares es fundamental el poseer un sistema de comunicación que les permita mantener una unidad estructural y funcional que coordine a los billones de células que los conforman y, con ello lograr una regulación de toda la gama de procesos bioquímicos y fisiológicos llevados a cabo por estos organismos.

2. Modos de comunicación intercelular.

Los mecanismos que poseen los organismos pluricelulares para lograr una integración funcional, son los siguientes :

- A través de uniones intercelulares.
- Mediante la liberación de moléculas químicas. La cual puede llevarse a cabo en 2 formas diferentes :

a) **Hormonas**, secretadas por células endócrinas hacia el torrente sanguíneo y que actúan sobre un órgano blanco modificando su actividad metabólica.

b) **Neurotransmisores**, liberados por una célula nerviosa (presináptica) y que actúan sobre una célula contigua (postsináptica). Este modo de comunicación es privativo del Sistema Nervioso.

Dado que este último mecanismo de comunicación intercelular es el que nos interesa, detallaremos un poco más sobre él .

3. Bases morfológicas de la transmisión sináptica

El Sistema Nervioso Central (SNC) está constituido, además de vasos sanguíneos y tejido conjuntivo, por dos tipos celulares: las células gliales y las células nerviosas.

CELULAS GLIALES : Término derivado del griego "pegamento". Son de 10 a 50 veces más abundantes que las células nerviosas y constituyen el soporte estructural de estas últimas. Además, llevan a cabo funciones importantes como la remoción de desechos después de muerte o daño neuronal así como de moléculas químicas del espacio intersináptico, el mantenimiento de las concentraciones extracelulares de potasio, y en el desarrollo embrionario sirven como guías en la migración neuronal. Además un tipo especial de célula glial envuelve con su membrana a algunas proyecciones de las células nerviosas.

CELULAS NERVIOSAS : La unidad anatómica y funcional del sistema nervioso son las neuronas, las cuales son, tal como Don Santiago Ramón y Cajal lo postuló en 1895 en el principio de especificidad conectiva, unidades biológicas independientes que entran en contacto con sus similares, no por continuidad sino por contigüidad (el cerebro humano con sus casi 1350 g de peso posee aproximadamente 100 mil millones de ellas), formando una red neuronal bien establecida a través de conexiones específicas y precisas. Aunque la variedad morfológica de las neuronas incluye formas como las de canasta, piramidales, estrelladas, fusiformes, esféricas y otras, es posible distinguir en todas ellas una unidad morfológica en la que se puede apreciar las siguientes estructuras :

SOMA : El cuerpo celular o pericarión posee un diámetro aproximado de 5 a más de 100 μm y es el centro biosintético de la célula. El citoplasma posee el núcleo celular, el retículo endoplásmico rugoso (que se organiza en agregados y forma los corpúsculos de Nissl) encargado de la síntesis de proteínas que son transportadas hacia toda la neurona, el aparato de Golgi y demás organelos celulares.

DENDRITAS : Son expansiones que parten del soma para formar inmediatamente múltiples ramificaciones, proporcionan la superficie por la cual se reciben las señales de entrada (aférentes) de otras células.

AXON : Se origina en una región cónica del pericarión denominada prominencia axónica. Constituye la vía eferente de la información que, habiendo sido recibida por las dendritas y procesada por el soma, es enviada hacia otras células. La membrana plasmática de las células de Schwann, que es un tipo de célula glial, gira alrededor de algunos axones y los recubre dando lugar a una capa aislante y cilíndrica de membranas firmemente apretadas y que cubre algunos segmentos de la longitud del axón. Esta recubierta, conocida como vaina de mielina, no es continua a todo lo largo del axón sino que a determinados intervalos se suspende para dar lugar a los nódulos de Ranvier, que son pequeños huecos (de aproximadamente 1 μm) entre segmentos adyacentes de mielina, donde la membrana de la neurona permanece expuesta al medio extracelular, y cuya presencia es fundamental en la conducción rápida de los impulsos nerviosos.

Los axones pueden medir desde algunas micras de longitud

(células tipo Golgi II), hasta más de un metro (células tipo Golgi I) y cerca de su tramo final se divide en múltiples ramas que en su porción terminal se ensanchan para dar lugar a un botón especializado para la comunicación interneuronal. Este botón recibe el nombre de sinapsis, término derivado del griego e introducido por Sherrington en 1897 para denominar la región de comunicación en que una célula, separada por un espacio intersináptico, se comunica con otra.

Existen dos tipos de sinapsis, denominadas como sinapsis eléctrica y sinapsis química.

SINAPSIS ELECTRICA : Las primeras sugerencias de este tipo de comunicación se deben a los estudios de Hermann en 1879 y después por Lapicque y Forbes. La transmisión se logra mediante un acoplamiento eléctrico que se da a través de uniones intercelulares del tipo de las uniones estrechas (gap junctions). El espacio que separa a las membranas es muy angosto ($2 \cdot 10^{-8}$ nm) y representa la décima parte de la distancia que existe entre las membranas de una sinapsis química. Aunque su presencia es limitada en los vertebrados, sobre todo en los llamados superiores, este tipo de sinapsis presenta características fundamentales, una de ellas es que permite una transmisión rápida de la información, lo cual es de suma importancia y ventajoso en respuestas como la de escape en los peces o de invertebrados como los insectos.

SINAPSIS QUIMICA : Las primeras evidencias de su existencia fueron aportadas por Dubois-Reymond, quien en 1877 postuló la secreción de una sustancia excitadora como causante de la

postuló la secreción de una sustancia excitadora como causante de la contracción muscular. En este caso, las membranas pre y postsináptica se encuentran separadas por un espacio de aproximadamente 20 nm que está enriquecido en la proteína llamada agrina y en proteoglicanos (Kelly, 1988) y son las encargadas de mantener la estructura de la sinapsis. Constituyen la forma predominante de comunicación en el sistema nervioso central y periférico en los vertebrados, así como en muchos invertebrados (Alberts et al., 1983; Bonilla, 1985; Snyder, 1985).

4. Bases moleculares de la transmisión sináptica.

a) Importancia del calcio en los sistemas biológicos.

El ión calcio (Ca^{2+}) es uno de los cationes fundamentales en todo organismo vivo. La gran diversidad de funciones que realiza se puede clasificar en 4 aspectos primordiales :

ESTRUCTURAL: Ejerce efectos sobre las propiedades funcionales de las biomembranas, por lo que en su ausencia éstas sufren variaciones, como por ejemplo, un cambio de la permeabilidad selectiva a los diferentes iones.

COFACTOR EN REACCIONES ENZIMATICAS: El Ca^{2+} funciona, por ejemplo, como el factor 4 en el proceso de hemostasia, en la conversión de protrombina a trombina y además es cofactor de otras enzimas.

ELECTRICA: Este catión estabiliza cargas de membrana. Es un ión esencial para el funcionamiento de canales iónicos, ya que se une a las cargas negativas fijas en la superficie de la membrana.

REGULADOR INTRACELULAR: La acción de este catión como

INDICE

	página
I. RESUMEN	10
II. PREFACIO	11
III. INTRODUCCION	
A. GENERALIDADES	
1. Importancia de la comunicación intercelular	13
2. Modos de comunicación intercelular	13
3. Bases morfológicas de la transmisión sináptica ..	14
4. Bases moleculares de la transmisión sináptica	
a) Importancia del calcio en los sistemas biológicos	17
b) Mecanismo de liberación de transmisores e importancia del calcio en este proceso	18
B. LA 4-AMINOPIRIDINA	
1. Generalidades. Características físicas y químicas	21
2. Farmacocinética y metabolismo	21
3. Usos y aplicaciones clínicas	24
4. Efectos <i>in vitro</i>	25
5. Efectos <i>in vivo</i>	27
6. Mecanismo de acción	28
a) Evidencias de su papel como bloqueador de los canales de potasio	29
b) Evidencias de un efecto directo sobre los canales de calcio sensibles a voltaje	30
C. LAS DIHIDROPIRIDINAS	
1. Generalidades. Características físicas y químicas	32

1. Introducción	33
2. Objetivos	34
3. Metodología	35
I. Materiales	35
II. Procedimientos	36
III. Análisis estadístico	38
IV. RESULTADOS	45
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	48
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
VIII. ANEXOS	50
IX. RESUMEN	51
X. ABSTRACT	52
XI. GLOSARIO	53
XII. BIBLIOGRAFÍA	54
XIII. ANEXOS	55
XIV. RESUMEN	56
XV. ABSTRACT	57
XVI. GLOSARIO	58
XVII. BIBLIOGRAFÍA	59
XVIII. ANEXOS	60
XIX. RESUMEN	61
XX. ABSTRACT	62
XXI. GLOSARIO	63
XXII. BIBLIOGRAFÍA	64
XXIII. ANEXOS	65
XXIV. RESUMEN	66
XXV. ABSTRACT	67
XXVI. GLOSARIO	68
XXVII. BIBLIOGRAFÍA	69
XXVIII. ANEXOS	70
XXIX. RESUMEN	71
XXX. ABSTRACT	72
XXXI. GLOSARIO	73
XXXII. BIBLIOGRAFÍA	74
XXXIII. ANEXOS	75
XXXIV. RESUMEN	76
XXXV. ABSTRACT	77
XXXVI. GLOSARIO	78
XXXVII. BIBLIOGRAFÍA	79
XXXVIII. ANEXOS	80
XXXIX. RESUMEN	81
XL. ABSTRACT	82
XLI. GLOSARIO	83
XLII. BIBLIOGRAFÍA	84
XLIII. ANEXOS	85
XLIV. RESUMEN	86
XLV. ABSTRACT	87
XLVI. GLOSARIO	88
XLVII. BIBLIOGRAFÍA	89
XLVIII. ANEXOS	90
XLIX. RESUMEN	91
L. ABSTRACT	92
LI. GLOSARIO	93
LII. BIBLIOGRAFÍA	94
LIII. ANEXOS	95
LIV. RESUMEN	96
LV. ABSTRACT	97
LVI. GLOSARIO	98
LVII. BIBLIOGRAFÍA	99
LVIII. ANEXOS	100
LIX. RESUMEN	101
LX. ABSTRACT	102
LXI. GLOSARIO	103
LXII. BIBLIOGRAFÍA	104
LXIII. ANEXOS	105
LXIV. RESUMEN	106
LXV. ABSTRACT	107
LXVI. GLOSARIO	108
LXVII. BIBLIOGRAFÍA	109
LXVIII. ANEXOS	110
LXIX. RESUMEN	111
LXX. ABSTRACT	112
LXXI. GLOSARIO	113
LXXII. BIBLIOGRAFÍA	114
LXXIII. ANEXOS	115
LXXIV. RESUMEN	116
LXXV. ABSTRACT	117
LXXVI. GLOSARIO	118
LXXVII. BIBLIOGRAFÍA	119
LXXVIII. ANEXOS	120
LXXIX. RESUMEN	121
LXXX. ABSTRACT	122
LXXXI. GLOSARIO	123
LXXXII. BIBLIOGRAFÍA	124
LXXXIII. ANEXOS	125
LXXXIV. RESUMEN	126
LXXXV. ABSTRACT	127
LXXXVI. GLOSARIO	128
LXXXVII. BIBLIOGRAFÍA	129
LXXXVIII. ANEXOS	130
LXXXIX. RESUMEN	131
LXXXX. ABSTRACT	132
LXXXXI. GLOSARIO	133
LXXXXII. BIBLIOGRAFÍA	134
LXXXXIII. ANEXOS	135
LXXXXIV. RESUMEN	136
LXXXXV. ABSTRACT	137
LXXXXVI. GLOSARIO	138
LXXXXVII. BIBLIOGRAFÍA	139
LXXXXVIII. ANEXOS	140
LXXXXIX. RESUMEN	141
LXXXXX. ABSTRACT	142
LXXXXXI. GLOSARIO	143
LXXXXXII. BIBLIOGRAFÍA	144
LXXXXXIII. ANEXOS	145
LXXXXXIV. RESUMEN	146
LXXXXXV. ABSTRACT	147
LXXXXXVI. GLOSARIO	148
LXXXXXVII. BIBLIOGRAFÍA	149
LXXXXXVIII. ANEXOS	150
LXXXXXIX. RESUMEN	151
LXXXXXX. ABSTRACT	152
LXXXXXXI. GLOSARIO	153
LXXXXXXII. BIBLIOGRAFÍA	154
LXXXXXXIII. ANEXOS	155
LXXXXXXIV. RESUMEN	156
LXXXXXXV. ABSTRACT	157
LXXXXXXVI. GLOSARIO	158
LXXXXXXVII. BIBLIOGRAFÍA	159
LXXXXXXVIII. ANEXOS	160
LXXXXXXIX. RESUMEN	161
LXXXXXXX. ABSTRACT	162
LXXXXXXXI. GLOSARIO	163
LXXXXXXXII. BIBLIOGRAFÍA	164
LXXXXXXXIII. ANEXOS	165
LXXXXXXXIV. RESUMEN	166
LXXXXXXXV. ABSTRACT	167
LXXXXXXXVI. GLOSARIO	168
LXXXXXXXVII. BIBLIOGRAFÍA	169
LXXXXXXXVIII. ANEXOS	170
LXXXXXXXIX. RESUMEN	171
LXXXXXXXX. ABSTRACT	172
LXXXXXXXXI. GLOSARIO	173
LXXXXXXXII. BIBLIOGRAFÍA	174
LXXXXXXXIII. ANEXOS	175
LXXXXXXXIV. RESUMEN	176
LXXXXXXXV. ABSTRACT	177
LXXXXXXXVI. GLOSARIO	178
LXXXXXXXVII. BIBLIOGRAFÍA	179
LXXXXXXXVIII. ANEXOS	180
LXXXXXXXIX. RESUMEN	181
LXXXXXXXX. ABSTRACT	182
LXXXXXXXXI. GLOSARIO	183
LXXXXXXXII. BIBLIOGRAFÍA	184
LXXXXXXXIII. ANEXOS	185
LXXXXXXXIV. RESUMEN	186
LXXXXXXXV. ABSTRACT	187
LXXXXXXXVI. GLOSARIO	188
LXXXXXXXVII. BIBLIOGRAFÍA	189
LXXXXXXXVIII. ANEXOS	190
LXXXXXXXIX. RESUMEN	191
LXXXXXXXX. ABSTRACT	192
LXXXXXXXXI. GLOSARIO	193
LXXXXXXXII. BIBLIOGRAFÍA	194
LXXXXXXXIII. ANEXOS	195
LXXXXXXXIV. RESUMEN	196
LXXXXXXXV. ABSTRACT	197
LXXXXXXXVI. GLOSARIO	198
LXXXXXXXVII. BIBLIOGRAFÍA	199
LXXXXXXXVIII. ANEXOS	200

1. Efecto de la nifedipina sobre las sacudidas de perico mojado provocadas por la inyección intraperitoneal de la 4-aminopiridina	52
2. Actividad eléctrica epileptiforme asociada con las convulsiones límbicas y las sacudidas de perico mojado	56
3. Modificaciones por la nifedipina de la actividad epileptiforme generada por la administración intraperitoneal de la 4-aminopiridina	61
4. Pálico convulsivo inducido por la administración intraperitoneal de la 4-aminopiridina	66
5. Efecto de la nifedipina sobre el patrón convulsivo inducido por la aplicación intraperitoneal de la 4-aminopiridina	66
6. Actividad eléctrica epileptiforme asociada a las convulsiones tónico generalizadas	66
7. Efecto de la nifedipina sobre la actividad eléctrica asociada a las convulsiones tónico generalizadas	72
 VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES	
1. Convulsiones límbicas y tónico generalizadas inducidas por la administración intraperitoneal o intraperitoneal de la 4-aminopiridina	73
2. Potenciación por la nifedipina de las convulsiones tónico generalizadas	76
3. Sacudidas de perico mojado provocadas por la aplicación intraperitoneal de la 4-aminopiridina	78
4. Inducción de actividad eléctrica epileptiforme ..	80
 VIII. REFERENCIAS	
	83

Los mecanismos moleculares que, a nivel neuronal, dan base al desarrollo de la epileptogénesis son, en gran parte desconocidos. Uno de los enfoques para estudiar la epilepsia es el modelo experimental con la 4-aminopiridina. Se sabe que esta droga produce convulsiones en una amplia variedad de especies animales, sin embargo su mecanismo de acción aún no está bien entendido. La 4-AP se ha usado ampliamente como un bloqueador de los canales de potasio, pero también hay evidencias de que está afectando directamente a los canales de calcio sensibles a voltaje, provocando con ello la generación de corrientes de calcio, un catión que tiene un papel crucial en la generación de crisis epileptogénicas y en la acción de drogas convulsivas y anticonvulsivas.

El presente trabajo estuvo encaminado a tratar de dilucidar el mecanismo de acción de la 4-AP, para ello caracterizamos los patrones conductuales y electroencefalográficos de la actividad epiléptica inducida al administrar esta droga por vía intrahipocámpica e intraperitoneal. En otro enfoque experimental, probamos a la nifedipina, una dihidropiridina antagonista de los canales de calcio sensibles a voltaje, como posible antagonista de los efectos de la 4-AP. Los resultados muestran una potenciación paradójica de los patrones epilépticos inducidos por la 4-AP.

Al surgir los primeros organismos unicelulares e ir evolucionando, eventualmente surgen organismos de una complejidad cada vez mayor hasta culminar con los organismos pluricelulares. Así, los mecanismos evolutivos han dado lugar a un sinnúmero de especies cuya diversidad abarca desde seres procariontes a eucariontes, de autótrofos a heterótrofos, desde plantas a animales y desde unicelulares hasta multicelulares. Esta última diferencia da pie a toda una serie de especulaciones e investigaciones en torno a la complejidad celular, morfológica y fisiológica que caracteriza a los organismos pluricelulares. A lo largo del tiempo geológico, los organismos con determinadas características que les permitieron optimizar al máximo sus procesos fisiológicos, pudieron verse favorecidos por la selección natural. Entre estas características, la comunicación entre las células constituyó un mecanismo crucial para la supervivencia de cualquier ser vivo multicelular. De esta manera, todas las especies que observamos en la actualidad, incluida la nuestra, son las que han logrado sobrevivir, hasta ahora, gracias a que poseemos los mecanismos que nos hacen estar entre los más aptos y mejor adaptados al medio ambiente.

Por todo lo anterior, es de importancia crucial para el biólogo tratar de esclarecer y entender, desde un punto de vista fisiológico pero también evolutivo, las características que nos han permitido sobrevivir como especie. Es bien sabido que muchos organismos unicelulares comparten con los vertebrados toda una serie de moléculas químicas que, sin embargo, son utilizadas en

procesos distintos y a través de mecanismos diferentes. Así, se sabe que algunos peces, al igual que el hombre, poseen la hormona prolactina, o que organismos unicelulares poseen catecolaminas, serotonina y acetilcolina (Roth et al. 1982) y que los paramecios presentan corrientes iónicas similares a las de las células nerviosas (Hinrichsen y Schultz, 1988). Además, organismos como los erizos de mar poseen moléculas como la noradrenalina, la dopamina, la serotonina y la acetilcolina (Schmitt, 1984). Tomando como modelos a estos organismos, y a otros más cercanos al hombre en la escala filogenética, tales como los roedores, debemos tratar de dilucidar, cada vez con mayor detalle, los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que operan en los organismos multicelulares para mantener una armonía celular y una integridad bien definida, así como tratar de esclarecer las ramas filogenéticas por las cuales estos mecanismos han evolucionado.

1. Importancia de la comunicación intercelular.

Tomando en consideración la importancia adaptativa y evolutiva que constituye la comunicación intercelular, queda claro que para los organismos multicelulares es fundamental el poseer un sistema de comunicación que les permita mantener una unidad estructural y funcional que coordine a los billones de células que los conforman y, con ello lograr una regulación de toda la gama de procesos bioquímicos y fisiológicos llevados a cabo por estos organismos.

2. Modos de comunicación intercelular.

Los mecanismos que poseen los organismos pluricelulares para lograr una integración funcional, son los siguientes :

- A través de uniones intercelulares.
- Mediante la liberación de moléculas químicas. La cual puede llevarse a cabo en 2 formas diferentes :

a) **Hormonas**, secretadas por células endócrinas hacia el torrente sanguíneo y que actúan sobre un órgano blanco modificando su actividad metabólica.

b) **Neurotransmisores**, liberados por una célula nerviosa (presináptica) y que actúan sobre una célula contigua (postsináptica). Este modo de comunicación es privativo del Sistema Nervioso.

Dado que este último mecanismo de comunicación intercelular es el que nos interesa, detallaremos un poco más sobre él .

3. Bases morfológicas de la transmisión sináptica

El Sistema Nervioso Central (SNC) está constituido, además de vasos sanguíneos y tejido conjuntivo, por dos tipos celulares: las células gliales y las células nerviosas.

CELULAS GLIALES : Término derivado del griego "pegamento". Son de 10 a 50 veces más abundantes que las células nerviosas y constituyen el soporte estructural de estas últimas. Además, llevan a cabo funciones importantes como la remoción de desechos después de muerte o daño neuronal así como de moléculas químicas del espacio intersináptico, el mantenimiento de las concentraciones extracelulares de potasio, y en el desarrollo embrionario sirven como guías en la migración neuronal. Además un tipo especial de célula glial envuelve con su membrana a algunas proyecciones de las células nerviosas.

CELULAS NERVIOSAS : La unidad anatómica y funcional del sistema nervioso son las neuronas, las cuales son, tal como Don Santiago Ramón y Cajal lo postuló en 1895 en el principio de especificidad conectiva, unidades biológicas independientes que entran en contacto con sus similares, no por continuidad sino por contigüidad (el cerebro humano con sus casi 1350 g de peso posee aproximadamente 100 mil millones de ellas), formando una red neuronal bien establecida a través de conexiones específicas y precisas. Aunque la variedad morfológica de las neuronas incluye formas como las de canasta, piramidales, estrelladas, fusiformes, esféricas y otras, es posible distinguir en todas ellas una unidad morfológica en la que se puede apreciar las siguientes estructuras :

SOMA : El cuerpo celular o Pericarión posee un diámetro aproximado de 5 a más de 100 μm y es el centro biosintético de la célula. El citoplasma posee el núcleo celular, el retículo endoplásmico rugoso (que se organiza en agregados y forma los corpúsculos de Nissl) encargado de la síntesis de proteínas que son transportadas hacia toda la neurona, el aparato de Golgi y demás organelos celulares.

DENDRITAS : Son expansiones que parten del soma para formar inmediatamente múltiples ramificaciones, proporcionan la superficie por la cual se reciben las señales de entrada (aférentes) de otras células.

AXON : Se origina en una región cónica del pericarión denominada prominencia axónica. Constituye la vía eferente de la información que, habiendo sido recibida por las dendritas y procesada por el soma, es enviada hacia otras células. La membrana plasmática de las células de Schwann, que es un tipo de célula glial, gira alrededor de algunos axones y los recubre dando lugar a una capa aislante y cilíndrica de membranas firmemente apretadas y que cubre algunos segmentos de la longitud del axón. Esta recubierta, conocida como vaina de mielina, no es continua a todo lo largo del axón sino que a determinados intervalos se suspende para dar lugar a los nódulos de Ranvier, que son pequeños huecos (de aproximadamente 1 μm) entre segmentos adyacentes de mielina, donde la membrana de la neurona permanece expuesta al medio extracelular, y cuya presencia es fundamental en la conducción rápida de los impulsos nerviosos.

Los axones pueden medir desde algunas micras de longitud

(células tipo Golgi II), hasta más de un metro (células tipo Golgi I) y cerca de su tramo final se divide en múltiples ramas que en su porción terminal se ensanchan para dar lugar a un botón especializado para la comunicación interneuronal. Este botón recibe el nombre de sinapsis, término derivado del griego e introducido por Sherrington en 1897 para denominar la región de comunicación en que una célula, separada por un espacio intersináptico, se comunica con otra.

Existen dos tipos de sinapsis, denominadas como sinapsis eléctrica y sinapsis química.

SINAPSIS ELECTRICA : Las primeras sugerencias de este tipo de comunicación se deben a los estudios de Hermann en 1879 y después por Lapicque y Forbes. La transmisión se logra mediante un acoplamiento eléctrico que se da a través de uniones intercelulares del tipo de las uniones estrechas (gap junctions). El espacio que separa a las membranas es muy angosto (2^{10} nm) y representa la décima parte de la distancia que existe entre las membranas de una sinapsis química. Aunque su presencia es limitada en los vertebrados, sobre todo en los llamados superiores, este tipo de sinapsis presenta características fundamentales, una de ellas es que permite una transmisión rápida de la información, lo cual es de suma importancia y ventajoso en respuestas como la de escape en los peces o de invertebrados como los insectos.

SINAPSIS QUIMICA : Las primeras evidencias de su existencia fueron aportadas por Dubois-Reymond, quien en 1877 postuló la secreción de una sustancia excitadora como causante de la

postuló la secreción de una sustancia excitadora como causante de la contracción muscular. En este caso, las membranas pre y postsináptica se encuentran separadas por un espacio de aproximadamente 20 nm que está enriquecido en la proteína llamada agrina y en proteoglicanos (Kelly, 1983) y son las encargadas de mantener la estructura de la sinapsis. Constituyen la forma predominante de comunicación en el sistema nervioso central y periférico en los vertebrados, así como en muchos invertebrados (Alberts et al. 1983; Bonilla, 1985; Snyder, 1985).

4. Bases moleculares de la transmisión sináptica.

a) Importancia del calcio en los sistemas biológicos.

El ión calcio (Ca^{2+}) es uno de los cationes fundamentales en todo organismo vivo. La gran diversidad de funciones que realiza se puede clasificar en 4 aspectos primordiales :

ESTRUCTURAL: Ejerce efectos sobre las propiedades funcionales de las biomembranas, por lo que en su ausencia éstas sufren variaciones, como por ejemplo, un cambio de la permeabilidad selectiva a los diferentes iones.

COFACTOR EN REACCIONES ENZIMATICAS: El Ca^{2+} funciona, por ejemplo, como el factor 4 en el proceso de hemostasia, en la conversión de protrombina a trombina y además es cofactor de otras enzimas.

ELECTRICA: Este catión estabiliza cargas de membrana. Es un ión esencial para el funcionamiento de canales iónicos, ya que se une a las cargas negativas fijas en la superficie de la membrana.

REGULADOR INTRACELULAR: La acción de este catión como

segundo mensajero en el proceso de liberación de neurotransmisores es bien conocida. También se sabe que ejerce un efecto modulador de diversos procesos celulares, por ejemplo, en la contracción muscular, a través de una interacción directa con la actina fibrosa, en el transporte intracelular al regular el ensamble de microtúbulos, en la proliferación celular al regular la síntesis de ADN de epitelios y mesénquima. Además, regula muchas otras funciones como fecundación, adhesión celular e inclusive muerte celular (Rubin, 1974).

Al tener como antecedente la versatilidad de funciones del calcio mencionaremos ahora su importancia en el sistema que nos ocupa.

b) Mecanismo de liberación de transmisores e importancia del calcio en este proceso.

Como todo tipo celular, la neurona se halla inmersa en un fluido extracelular que difiere en composición del medio intracelular. Entre otras diferencias, el medio externo tiene 10 veces más sodio pero el medio interno es unas 10 veces más rico en ión potasio. Esta diferencia de concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana plasmática, trae como consecuencia una diferencia de voltaje (voltaje de membrana, V_m) que, en estado de reposo, es decir en ausencia de variaciones o estímulos eléctricos (potencial de reposo), corresponde a un valor en que el interior neuronal es unos 70 milivolts (mV) negativo respecto al exterior. Las disminuciones en este V_m traen como consecuencia variaciones en la permeabilidad y los flujos iónicos, lo que provoca la aparición de un potencial (potencial de acción, PA), el cual es la manifestación eléctrica del impulso nervioso.

El inicio de la secreción de transmisores en la sinapsis, es uno de los ejemplos mejor conocidos de la acción del ión calcio como segundo mensajero.

Cuando la membrana de la célula presináptica se halla en reposo la permeabilidad al calcio es muy baja. En estas condiciones, la concentración citoplásmica libre es de aproximadamente 10^{-7} M, valor que contrasta grandemente con la concentración extracelular que es casi 4 órdenes de magnitud mayor (2.5×10^{-3} M). Este gradiente electroquímico se mantiene tanto por la baja permeabilidad al ión, como por los mecanismos de expulsión y de amortiguamiento citoplásmicos que detallaremos más adelante. Cuando un PA es conducido desde el soma hasta la terminal presináptica los canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV) se abren en respuesta a la despolarización de la membrana. Estos CCSV, situados en la zona activa de la terminal nerviosa, son los encargados de transducir la despolarización presináptica en una corriente entrante de Ca^{2+} . El Ca^{2+} entra al interior celular con una fuerza electromotriz resultante de la distribución asimétrica en ambos lados de la membrana, con lo que se crea una elevación local y transitoria de la concentración de calcio ionizado intraterminal que es esencial para la liberación de los neurotransmisores.

Las pruebas más directas de la importancia del Ca^{2+} en el proceso de liberación de transmisores fueron aportadas por Miledi (1973), quien al inyectar Ca^{2+} (o estroncio) en la terminal presináptica de la sinapsis del axón gigante de calamar Loligo vulgaris, en ausencia de variaciones en el V_m , indujo la liberación de una molécula transmisora; además esta entrada de

Ca^{2+} fue demostrada por Llinás et al, (1972) utilizando el colorante fluorescente aequorina.

Actualmente no es bien conocido el mecanismo mediante el cual se logra la liberación del transmisor. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que el Ca^{2+} podría estar interaccionando con alguna de las proteínas presentes en las vesículas sinápticas, tales como la P 38 o la sinaptofisina, y con ello lograr una variación de la interacción de los elementos del citoesqueleto con las vesículas sinápticas y la membrana plasmática (Kelly, 1988). También se ha propuesto que el Ca^{2+} este activando una proteína cinasa dependiente de este ión lo que aumentaría la fosforilación de la sinapsina I e iniciaría la liberación del transmisor (Landis et al, 1988). Por otra parte, también se ha sugerido que el Ca^{2+} almacenado en las mitocondrias podría estar participando de un modo importante en este proceso (Alnaes y Rahamimoff, 1975; Sandoval, 1980).

Cuando la terminal es repolarizada, es decir, cuando regresa a su valor de V_m inicial, la tasa de liberación del neurotransmisor declina rápidamente. Lo anterior probablemente se debe a que los CCSV, además de ser muy selectivos para el catión, permanecen abiertos sólo el tiempo que dura la despolarización; también son importantes la difusión del Ca^{2+} , así como los mecanismos encargados de amortiguar y mantener su concentración intraterminal en un valor cercano a 100 nM. Los mecanismos celulares que han sido involucrados en este proceso son los siguientes:

- proteínas plasmáticas que fijan calcio: calmodulina, paraalbúmina.

- captura por organelos intracelulares: retículo endoplásmico liso (REL), también llamado "calciosomas", mitocondrias, y las propias vesículas sinápticas.

- transporte de calcio transmembranal: bomba de calcio dependiente de ATP localizada en el REL y la membrana plasmática, y el intercambiador sodio/calcio en la membrana plasmática que constituye el mecanismo prioritario en las células nerviosas (Blaustein, 1988).

B. LA 4-AMINOPIRIDINA.

1. Generalidades. Características físicas y químicas.

La 4-aminopiridina (4-AP) fue desarrollada en 1963 por la Phillips Petroleum Co. Es un compuesto perteneciente a un grupo de derivados monodaminados (2-, 3- y 4- aminopiridina) y diaminados (2,3-, 2,6- y 3,4- diaminopiridina) de la piridina. La estructura de la 4-AP consiste en un anillo de piridina que tiene unido en su carbono 4 a un grupo amino (Fig. 1). Es un compuesto polar, con un peso molecular de 94.13, posee un pKa de 9.17 a 20° C, por lo cual existe casi totalmente en su forma catiónica (98%) a pH fisiológico, y a un pH de 9 se encuentra un 40 a 50% en forma ionizada.

2. Farmacocinética y metabolismo.

El metabolismo y la excreción de este compuesto no se conocen. Sin embargo, la ausencia de efectos en depredadores de aves envenenadas experimentalmente con este compuesto, y en las crías de codornices sobrevivientes a un tratamiento crónico o agudo con 4-AP, indican una degradación rápida (Spyker et al, 1980), que ahora se sabe no es por acetilación como había sido

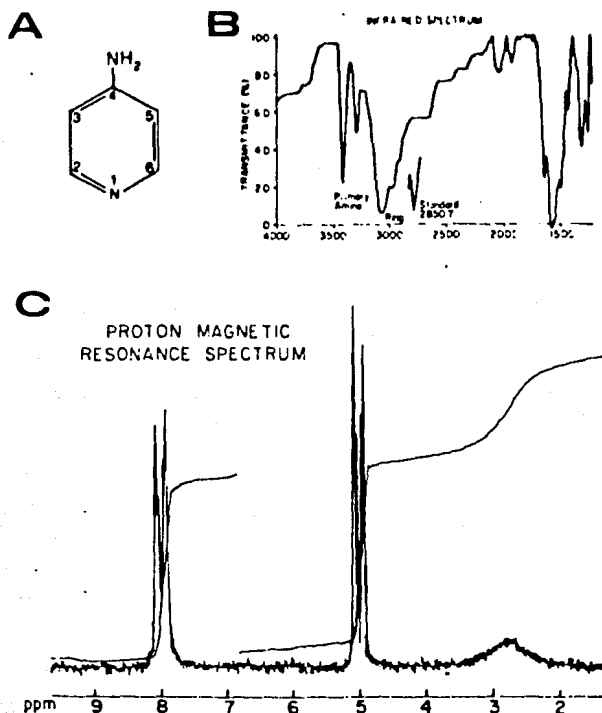


Fig. 1. A) Estructura química de la 4-aminopiridina; B) espectro infrarrojo y C) espectro de resonancia magnética.

Tomado de Spyker et al, 1980

1985).

En humanos voluntarios se ha medido la tasa de eliminación de esta droga, parece ser un proceso mediado casi exclusivamente por riñón, con una tasa de eliminación renal del 90%, lo que trae como consecuencia su rápida excreción del organismo, lográndose la eliminación total en 30 hrs (Uges et al. 1982). Sin embargo, a dosis elevadas, sus efectos pueden persistir por más tiempo ya que humanos intoxicados accidentalmente con 4-AP mostraron alteraciones motoras hasta 7 días después de su ingestión (Spyker et al. 1980).

Aunque su paso al SNC es rápido, cuando se administra sistémicamente en ratas, sólo el 5% de la concentración inicial inyectada alcanza la región cerebral (Damsina et al. 1988). Por otra parte, al inyectarse por vía intravenosa en ratones, su eliminación por riñón también es muy rápida y su paso total a través de la barrera HE se da en los primeros 5 min. Los órganos en los que se observa una mayor cantidad del compuesto incluyen, entre otros, riñón, vejiga urinaria, glándulas salivales y mucosas, médula adrenal, estómago, cerebro y otros. Dentro del cerebro, las estructuras con mayor densidad radioactiva incluyen corteza, tálamo, capa de células piramidales del hipocampo y células granulares del cerebelo (Berger, 1989). En ratas también se ha detectado en líquido cefalorraquídeo después de 5 min de aplicación intravenosa (Lemeignan, 1984).

3. Usos y aplicaciones clínicas.

El primer uso que se le dio a la 4-AP fue como un repelente para aves (conocido en el mercado como Avitrol) en sembradíos y

en aeropuertos. Este compuesto provoca en las aves desorientación, vuelo errático y emisión de sonidos de dolor causados por contracciones involuntarias del diafragma, lo que provoca que las aves no intoxicadas abandonen el área (Schafer, 1973).

En clínica se ha usado principalmente en el tratamiento de enfermedades que repercuten en fallas de la transmisión colinérgica. Así, el primer uso clínico de las aminopiridinas fue como agente anticurarinérgico en situaciones postoperatorias; como un antagonista de la parálisis muscular causada por la toxina botulínica o antibióticos (Thesleff, 1980); por ketamina-diazepam (Agoston, 1980); por iones de magnesio (Mg^{2+}) (Thesleff, 1980); y, junto con inhibidores de la acetilcolinesterasa como la neostigmina y piridostigmina, para antagonizar bloqueo muscular inducido por pancuronium (Ver Uges et al. 1982).

También ha sido usada en pacientes con síndrome del Eaton-Lambert y se han observado mejorías del padecimiento (Lundh et al. 1977). Además se han logrado mejorías en personas con miastenia gravis y miastenia congénita (Lundh et al. 1979; Murray y Newson-Davis, 1981), en pacientes con esclerosis múltiple (Bostock et al. 1981; Jones et al. 1983) y con corea de Huntington (ver Uges, 1982). En el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer algunas veces se han observado mejorías (Wesseling et al. 1984), sin embargo los resultados son contradictorios (Davidson et al. 1988).

Pese a que en todas los padecimientos mencionados los pacientes han mostrado mejorías, en muchos casos van acompañadas por efectos colaterales indeseables. Estos síntomas incluyen

efectos cardiovasculares (Ver Foldes et al. 1988) y de origen central, que van desde periodos de confusión, desorientación, ansiedad, inquietud e insomnio e inclusive convulsiones, limitando con todo ello su aplicación clínica (Spyker et al. 1980; Damsma et al. 1988).

4. Efectos in vitro.

Es bien conocido el efecto estimulador que ejerce la 4-AP en diversas preparaciones in vitro :

En uniones neuromusculares, en la placa terminal del nervio ciático y el músculo sartorio de Rana temporaria (Lundh y Thesleff, 1977; Molgó et al. 1977), en la del músculo extensor de rata (Lundh, 1978) y en la del músculo cervical de pollo (Marshall et al. 1979) aumenta la liberación de acetilcolina. Los potenciales de placa registrados en presencia de 3,4-diaminopiridina indican que se liberan miles de quanta del transmisor, en comparación con los casi 300 que lo hacen en ausencia de la droga (Ver Thesleff, 1980), aumenta el PA en la terminal nerviosa del músculo sartorio de rana (Burley y Jacob, 1981), además en el órgano eléctrico de Torpedo, que es un sistema neuromuscular modificado, genera descargas eléctricas gigantes de larga duración asociadas a un incremento en la cantidad de transmisor liberado (Parducz et al. 1987).

En sistema nervioso central, aumenta la amplitud de potenciales postsinápticos en sinapsis excitatorias e inhibitorias en médula espinal de gatos (Jankowska et al. 1977), y de rana (Galindo y Rudomin, 1978) y en neuronas neocorticales de rata (Kita et al. 1985), aumenta los potenciales de acción en

fibras desmielinizadas (Bostock et al. 1981), y la liberación espontánea de ácido γ -aminobutírico (GABA), glutamato y acetilcolina (ACh) en sinaptosomas de cerebro de ratón (Tapia y Sitges, 1982, Tapia et al. 1985), de glutamato en sinaptosomas de corteza de cuyo (Tibbs et al. 1983) y de dopamina en sinaptosomas de estriado (Arzate et al. 1986), de ACh en rebanadas de estriado (Dolezal y Tucek, 1983) y de corteza de ratas (Foldes et al. 1988).

En nervios colinérgico autónomos, en el ileo del cobayo, aumenta la liberación de transmisor (Vizi et al. 1977), a la vez que aumenta sus contracciones espontáneas (Arzate et al. 1984); en el bazo del gato (Kirperkar et al. 1977) y en la vena portal de la rata (Leander et al. 1977) aumenta la liberación de noradrenalina.

En células endócrinas cultivadas aumenta la liberación de prolactina, calcitonina y hormona paratiroidea (Ver Boschero et al. 1987); y provoca una facilitación de la secreción de oxitocina y vasopresina de hipófisis de rata (Bondy y Russell, 1988).

En apoyo a los datos fisiológicos mencionados, se ha obtenido un correlato morfológico de la acción presináptica de la 4-AP. Se ha observado, con técnicas de criofractura, un aumento en la frecuencia de fusión de vesículas por unidad de área en la membrana presináptica de motoneuronas de médula espinal de rata (Tokunga et al. 1979a; Tokunga et al. 1979b), un aumento en la cinética de la exocitosis sináptica, de más de 60 veces, en músculo pectoral de rana (Heuser y Reese, 1981) y una reducción de vesículas presinápticas, además de un decremento en el contenido

1987) y provoca una facilitación de la secreción de oxitocina y vasopresina de hipófisis de rata (Bondy y Russell, 1988).

En apoyo a los datos fisiológicos mencionados, se ha obtenido una correlación morfológica de la acción presináptica de la 4-AP. En la membrana presináptica de motoneuronas de médula espinal de rata se ha observado, con técnicas de criofractura, un incremento en la frecuencia de fusión de vesículas por unidad de área (Tokunga et al, 1979a; Tokunga et al, 1979b), en músculo pectoral de rana provoca un aumento en la cinética de la exocitosis sináptica de más de 60 veces (Heuser y Reese, 1981) y además, provoca una reducción de vesículas presinápticas y un decremento en el contenido intraterminal de ACh en el órgano eléctrico del Torpedo (Parducz et al, 1987).

5. Efectos in vivo.

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

También se ha demostrado que la aplicación intraestriatal, por microdialisis, de 4-AP en ratas incrementa la liberación de ACh y, en menor grado, de DA, además, su aplicación ip también incrementa la liberación de ACh en el estriado (Dausma et al, 1988).

6. Mecanismo de acción.

Aunque son varias las teorías que se han propuesto para explicar el mecanismo de acción de la 4-AP, todas coinciden en dos aspectos. En todos los modelos estudiados, o en casi todos, se ha demostrado una dependencia estricta del Ca^{2+} extracelular para poder observar los efectos ya mencionados. Además, éstos han sido explicados con base en una acción presináptica. Así, al no modificar la amplitud ni el curso temporal de los potenciales miniatura de placa terminal (PMPT), se ha excluido un efecto inhibitor de la colinesterasa y de un aumento en la sensibilidad de los receptores de ACh (Molgo et al, 1977; Lundh, 1978; Thesleff, 1980). En apoyo a una acción presináptica se ha observado que la 4-AP provoca un incremento en la amplitud de los potenciales de placa terminal (PPT), además de que las contracciones musculares producidas por este aumento en la transmisión no son observadas en músculos denervados (Molgo et al, 1977; Lundh, 1978).

Sin embargo, recientemente se ha propuesto que también interactúa con receptores colinérgicos postsinápticos en Aplysia, en nervios aislados de Helix (Ikemoto et al, 1987) y en diafragma de rata (Vital Brazil et al, 1989).

Algunas de las teorías propuestas sugieren que la 4-AP puede modificar la vía dependiente de Ca^{2+} en la liberación de transmisores, que puede variar las interacciones calcio-membrana (Dolezal y Tucek, 1983) o que puede disminuir los requerimientos del ión en la terminal (Vizi et al, 1977; Tapia y Sitges, 1982; Tapia et al, 1985). También se ha propuesto un efecto directo sobre los CCSV (Lundh y Thesleff, 1977; Lundh, 1978), del

terminales miniatura (mepps), se ha excluido un efecto inhibitorio de la colinesterasa y de un aumento en la sensibilidad de los receptores de ACh (Molgo et al. 1977; Lundh, 1978; Thesleff, 1980). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que también interactúa con receptores colinérgicos postsinápticos de *Aplysia*, en nervios aislados de *Helix* (Ver Ibáñez et al. 1987) y en diafragma de rata (Vital Brazil et al. 1989).

Ayudando lo anterior, se ha observado que la 4-AP provoca un incremento en la amplitud de los potenciales de placa terminal (epps), además de que las contracciones producidas (*in vivo* e *in vitro*) por este aumento en la transmisión no son observadas en músculos denervados que son estimulados directamente (Ver Molgo et al. 1977; Lundh, 1978).

Algunas de las teorías propuestas sugieren que la 4-AP puede estar modificando alóstericamente la vía dependiente de Ca^{2+} en la liberación de transmisores, que puede estar variando las interacciones calcio-membrana (Ver Golzalez y Tucek, 1983) o que puede estar disminuyendo los requerimientos del ion en la terminal (Vizi et al. 1977; Tapia y Sitges, 1982; Tapia et al. 1985). También se ha propuesto un efecto directo sobre los QUSV (Lundh y Thesleff, 1977; Lundh, 1978), del transmisor almacenado disponible para la liberación (Lundh, 1978) o un incremento del número de sitios activos de liberación (Burley y Jacobs, 1981).

a) Evidencias de su papel como bloqueador de los canales de potasio.

Es bien conocida la acción de la 4-AP como un bloqueador selectivo de los canales de potasio sensibles a voltaje (QPSV). Este bloqueo ha sido observado en axones de cucaracha, *Myxicola*,

en el nodo de Ranvier de rana (Ver Yeh et al. 1976a), en el axón gigante de calamar (Linás et al. 1976b; Yeh et al. 1976a y 1976b; Meves y Pichon, 1977); en músculo esquelético de rana (Molgó, 1977) y en ganglio pleural de nudibranchios (Thompson, 1982). La 4-AP lograría este efecto al pegarse a sitios dentro del canal iónico, sin alterar la cinética de apertura de los mismos (Ver Yeh et al. 1976b). El bloqueo específico puede deberse a que las dimensiones de la molécula de 4-AP son similares a las de un ión de potasio hidratado (4.45 Å de radio), además de que el grado de ionización que tiene a un pH fisiológico le daría la capacidad de pegarse a sitios de membrana ocupados por iones inorgánicos (Narahashi, 1974).

Basándose en lo anterior, se ha propuesto que un incremento en la cantidad de neurotransmisor liberado por un PA puede deberse a un bloqueo de la corriente saliente transitoria de potasio, prolongando la duración del PA, y con ello la apertura de los CCSV, permitiendo un aumento en la entrada de Ca^{2+} a la terminal y, en consecuencia, un aumento en la liberación de neurotransmisores, efecto similar al postulado para el tetraetilamonió por Katz y Miledi (1969).

La idea de una prolongación del PA surge de estudios en uniones neuromusculares en donde se observó que los potenciales inhibitorios y excitadores provocados aumentaban en amplitud en presencia de 4-AP (Ver Molgó et al. 1977). Este mecanismo se ha propuesto tanto para explicar el efecto en uniones neuromusculares (Molgó et al. 1977; Kirpekar et al. 1977), en los nervios colinérgicos autónomos (Vizi et al. 1977), en el nervio vago de rata (Galván et al. 1980) y en la vena portal de la rata

(Leander et al., 1977).

Un dato adicional en apoyo a este mecanismo es que, en diafragma de rata, la concentración mínima de 4-AP para observar un aumento en la liberación de transmisor es de 20 μM , la cual es parecida a la concentración mínima para provocar una prolongación del PA (Thomsen y Wilson, 1983).

Sin embargo, Burley y Jacobs (1981) encuentran que, en la placa terminal del nervio ciático y el músculo sartorio de rana, la concentración umbral requerida (μM) para aumentar la liberación es mucho menor que la necesaria (mM) para provocar una prolongación del PA (Burley y Jacobs, 1981; Rogawski y Barker, 1983). Además, descartan un efecto bloqueador de la corriente de potasio ya que la 4-AP no induce variaciones en el PA terminal del nervio ciático aún cuando se está induciendo un aumento en la liberación cuántica de al menos 2 veces. Además, una prolongación del PA sólo se ha observado en fibras no mielinizadas y, en fibras mielinizadas, sólo en las del tracto solitario (Ver Voskuyl y Albus, 1985) y en las del nervio vago del cuyo (Den Hertog et al., 1987).

b) Evidencias de un efecto directo sobre los canales de calcio sensibles a voltaje.

Paralelamente al mecanismo de acción mencionado, también se ha propuesto que, en uniones neuromusculares, la liberación aumentada se debe a efectos directos sobre CCSV en la terminal sináptica, facilitando de este modo la entrada de Ca^{2+} (Lundh y Thesleff, 1977; Lundh, 1978).

Apoyando esta teoría se han realizado diversos trabajos en los cuales los efectos observados no son explicados por un

OCSV en la terminación sináptica, facilitando de este modo el flujo de Ca^{2+} (Lundh y Tostieff, 1977; Lundh, 1978).

En apoyo a esta teoría se han realizado diversos trabajos en los cuales los efectos observados no son explicados por un aumento en la permeabilidad de potasio. Langowatz et al. (1977), reportan que la duración de las espigas presinápticas en las terminaciones de ramos distales con 4-AP no varía y por ello es difícil que un aumento de los FFES y de las FFES en ramos es una prolongación de la espiga presináptica. Galindo y Rudomin (1978), observan que la 4-AP revierte la supresión de la transmisión sináptica por Mg^{2+} y EGTA (un quelante de calcio) en médula espinal de rana y proponen un efecto directo sobre los OCSV. Molgo et al. (1979), sugieren que, en la unión neuromuscular de la rana, el efecto de la droga se debe a un mecanismo adicional al bloqueo de los canales de potasio. Lundh (1978) menciona que es posible que la 4-AP tenga un efecto similar a la guanidina que, sin tener una acción directa sobre los CPSV, provoca corrientes de Ca^{2+} .

Además, se ha demostrado un efecto directo aumentando las espigas de Ca^{2+} de neuronas hipocámpales (Segal y Barber, 1986) y en neuronas cultivadas de médula espinal de ratón (Kogawski y Barker, 1983).

Sin embargo, estas proposiciones han sido criticadas ya que el aumento en los PA terminales también se provoca en ausencia de Ca^{2+} extracelular (Burley y Jacobs, 1981) y, al no afectar los FFES, no puede afectar directamente la permeabilidad al Ca^{2+} (Thomsen y Wilson, 1983).

C. LAS DIHIDROPIRIDINAS

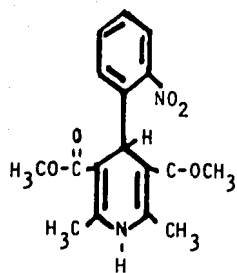
1. Generalidades. Características físicas y químicas.

La nifedipina (NF), al igual que otros compuestos similares como la nisoldipina (NS), la nitrendipina (NT) y la nimodipina (NM), son derivados 1,4-dihidropiridinas (Fig. 1). Las dihidropiridinas (DHF) son compuestos altamente liposolubles y parecen tener acceso a los canales de Ca^{2+} a través de la fase lipídica de la membrana. Las DHF son los compuestos más específicos y potentes que actúan sobre los canales de Ca^{2+} . Son moléculas sensibles a los rayos ultravioleta y su exposición a la luz natural causa su oxidación e inactivación, por lo que su acción puede ser rápidamente revertida por iluminación (Reuter et al, 1985).

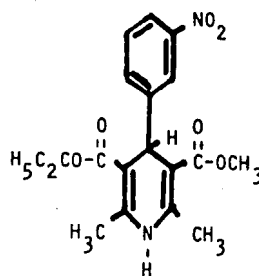
La NF (Ester dimetilico del ácido 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(6-nitro-fenil)-piridin-3,5-dicarbóxico) tiene un peso molecular de 346.3, es un compuesto con propiedades inotrópicas negativas (antagonistas) (Schramm et al, 1983), esto es, tiene la capacidad de bloquear el influjo de Ca^{2+} en músculo liso y cardíaco (Gredal et al, 1987).

2. Farmacocinética y metabolismo.

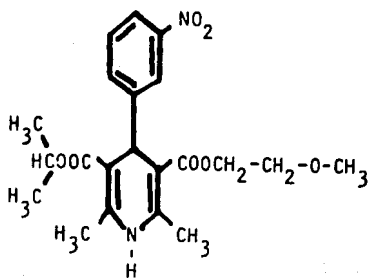
Los estudios experimentales en voluntarios sanos a los que se les dio una dosis oral de 30 mg de [^{14}C]-nimodipina mostraron que la forma primaria de eliminación de la droga es por vía urinaria. En estos individuos a las 96 horas, después de la ingestión del compuesto, se recuperó en la orina el 52 % del total, mientras que por heces se recuperó el 32 % (Lettieri et al, 1986).



NIFEDIPINA



NITRENDIPINA



NIMODIPINA

Fig. 2. Estructura química de algunas dihidropiridinas antagonistas de calcio.

1. Citoarquitectura.

En los roedores la formación hipocámpica se encuentra adyacente a las paredes ventroposterior y ventrolateral de la corteza cerebral. El hipocampo es una estructura que presenta una organización laminar, claramente limitada, de tal manera que una sección transversal como la que se muestra en la figura (3) representa a la estructura completa.

En esta estructura se pueden observar 3 regiones distintas, las cuales se conocen como asta de Ammon, giro dentado y subículo.

El asta de Ammon posee 6 diferentes estratos, los cuales se diferencian por la citoarquitectura presentada en cada uno de ellos y la cual es la siguiente :

ALVEUS.- el estrato más externo, posee fibras aferentes y eferentes a la estructura.

ORIENS.- con fibras del mismo tipo que el anterior, además de las llamadas células en canasta y dendritas basales de las células piramidales.

PIRAMIDAL.- que posee neuronas de este tipo e interneuronas inhibitorias.

RADIADO.- en el que arborizan las dendritas apicales de las células piramidales.

LACUNOSO-MOLECULAR.- que también contiene arborizaciones de las dendritas apicales de las células piramidales, además de las interneuronas y fibras aferentes

3. Aplicaciones clínicas.

Debido a las propiedades mencionadas la NF es un compuesto fuertemente vasodilatador, es por ello que se ha usado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como la angina de pecho y la hipertensión (Schram et al. 1983). También se ha propuesto un efecto antidepressivo (Mogilnicka et al. 1987; Czyrak et al. 1989). Además, en tratamientos experimentales con estos compuestos se han obtenido resultados positivos en disfunciones como falla cardíaca (Kubo et al. 1988), migraña (Olseen et al. 1988), hepatotoxicidad inducida por sustancias químicas (Thurman et al. 1988) o por hipercis (Landon et al. 1988) o por toxicidad letal por cocaína (Nahas et al. 1988).

4. Propiedades antiepilépticas de las dihidropiridinas.

Las dihidropiridinas han mostrado poseer propiedades antiepilépticas en varios modelos experimentales.

La NF tienen acción antiepiléptica en convulsiones inducidas en ratas por la administración de pentilentetrazol (PTZ) y provocadas por exposición de las ratas a alta presión (Dolin et al. 1988); por estimulación repetitiva (kindling) del hipocampo de ratas (Vezzani et al. 1988) y en epilepsia inducida en ratones por administración intracerebroventricular de BAY K 8644 (una DHF agonista de los CCNV).

La NM también ha mostrado propiedades similares, ya que contrarresta la epilepsia inducida en ratas por PTZ y por exposición del animal a altas presiones atmosféricas (Dolin et al. 1988); además previene epilepsia inducida en conejos por isquemia bicuculina (Meyer et al. 1986a), por PTZ (Meyer et

al. 1986a, Meyer et al. 1987), y la epilepsia inducida por estimulación eléctrica cortical en el conejo (Meyer et al. 1986b).

Asimismo, la NT también es capaz de antagonizar la epilepsia inducida por PTZ y por altas presiones atmosféricas (Dolin et al. 1988).

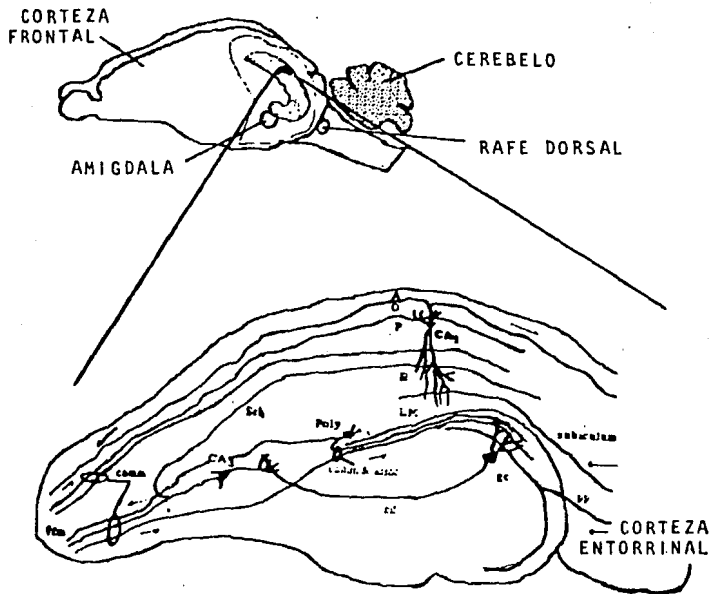


Fig. 3. Esquema de un corte transversal del hipocampo de la rata que muestra los principales tipos celulares y vías sinápticas. Los símbolos en este y en los siguientes esquemas son: A- alveus; O- estrato oriens; LM- estrato lacunosó-moleculare; poly- neuronas polimórficas; Sch- colaterales de Schaffer; CA3- región CA3; CA1- región CA1; comm- fibras comisurales; fim- fimbria; mf- fibras musgosas; gc- células granulares; pp- vía perforante; assoc- fibras de asociación.

Modificado de Pohorecki y Domino (1987).

células piramidales.

LACUNOSO-MOLECULAR: que también contiene arborizaciones de las dendritas apicales de las células piramidales, además de las interneuronas y fibras aferentes.

Además de esta distribución laminar, el estrato piramidal se ha delimitado en una serie de regiones, con base en diferencias citoarquitectónicas, las cuales corresponden al campo de Amón, CA1, CA2, CA3 y CA4.

Por otra parte, el giro dentado posee una estructura trilaminar constituida por las siguientes capas:

MOLECULAR: el estrato más superficial, contiene a las dendritas de las células granulares.

GRANULAR: con células del mismo nombre que originan axones denominados "fibras musgosas" por la gran cantidad de varicosidades que presentan que se proyectan a la región CA3.

HILUS: que contiene neuronas polimórficas, fusiformes y piramidales modificadas, el tipo neuronal más común son las "células musgosas".

La última gran división de la formación hipocámpica es el subículo, es una continuación de la corteza entorrinal que presenta una transición celular y una diferenciación citoarquitectónica que da lugar a una regionalización de la estructura en: presubículo, parasubículo, subículo propio y postsubículo.

2. Vías neuronales aferentes e interconexiones intra e interhipocámpicas.

La información proveniente desde el locus coeruleus, rafé, tálamo, septum y amígdala llegan a la corteza entorrinal y forman

la vía perforante (VP), que es la principal vía aferente al hipocampo. Algunas de las fibras que constituyen a la VP provienen de la corteza entorrinal, "perforan" el subículo y llegan al estrato lacunoso-molecular y establecen sinapsis axodendríticas con las dendritas apicales de las células piramidales de las regiones CA3 y CA1. Sin embargo, la mayor parte de las fibras de la VP llegan al giro dentado, en donde hacen sinapsis axodendríticas con las células granulares; el neurotransmisor de estas fibras es el glutamato. A su vez, las células granulares emiten axones (las fibras musgosas) que hacen sinapsis con las espinas de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la región CA3, en la llamada capa lucida. El tipo de sinapsis establecido es el denominado "en passage" y aunque se han observado vesículas sinápticas en las varicosidades, no se ha definido aún si el neurotransmisor implicado en esta sinapsis es el glutamato o el aspartato.

Las neuronas de CA3 a su vez emiten axones que dan origen a unas fibras colaterales, denominadas colaterales de Schaffer, éstas van a la región CA1 y hacen sinapsis, principalmente, con las dendritas apicales de las células piramidales de esta región; el ácido glutámico es el neurotransmisor que funciona en esta sinapsis.

Las colaterales de Schaffer del hipocampo contralateral también dan lugar a otra importante vía de entrada a la estructura: la vía comisural. Sus fibras, que también se originan en el hilus, entran por la fimbria al hipocampo contralateral y hacen sinapsis con las dendritas apicales y basales de las neuronas piramidales en CA1 y CA3. Otra parte de las fibras van a

la capa molecular para hacer sinapsis con las interneuronas en cesta asociadas a las células granulares. La vía comisural también emplea al ácido glutámico como neurotransmisor.

3. Región CA1 hipocámpica. Organización y neuroquímica.

En la región CA1 del hipocampo (Fig. 4), o región superior como la denominó Cajal, además de las células piramidales y de las interconexiones ya descritas, se localizan las llamadas células en cesta. Al igual que en el giro dentado, estas neuronas extienden sus axones y los ponen en contacto con las dendritas y somas de las células piramidales y ejercen un efecto inhibitorio mediado por el GABA. Este tipo de inhibición es recurrente ya que las células piramidales también prolongan sus axones hacia el soma de la célula en cesta y así la excita.

En esta región existen además otras células GABAérgicas, que se encuentran en el estrato piramidal y son neuronas no piramidales las cuales proyectan sus axones a los estratos oriens y lacunoso-molecular.

Por otra parte, se sabe que las proyecciones colinérgicas hacia el hipocampo provienen del núcleo septal medial y del núcleo de la banda diagonal. Estas fibras van a través de la fimbria y sus terminales llegan al estrato oriens en CA3, al hilus, al giro dentado, al estrato piramidal, y a las dendritas basales de las neuronas piramidales en CA1.

En CA1 también se han detectado terminales de proyecciones noradrenérgicas que parten del locus coeruleus, pasan a través del cerebro anterior vía el fascículo medial y llegan al estrato lacunoso-molecular de esta región. Por otra parte, se ha

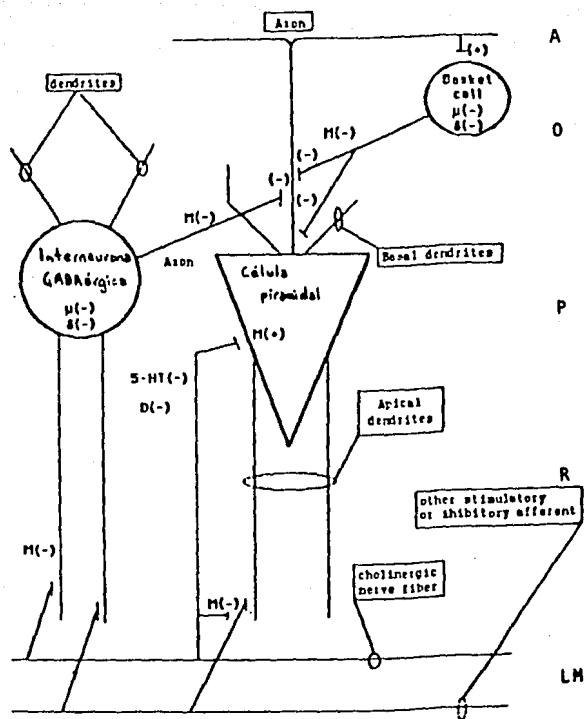


Fig. 4. Esquema que muestra las interconexiones neuronales existentes en la región CA1 del hipocampo. Las células en cesta y la interneurona GABAérgica inhiben a la neurona piramidal, a su vez las neuronas inhibitorias son inhibidas por opiáceos a través de receptores μ y δ . La ACh tiene un efecto excitador sobre la célula piramidal, un efecto inhibitor sobre las interneuronas y un efecto inhibitor presináptico sobre las vías inhibitorias y excitadoras aferentes al hipocampo. Las terminales colinérgicas están bajo inhibición tónica por 5-HT y posiblemente también por dopamina. (+) excitación (-) inhibición.

Modificado de Bohonadri y Pomini (1987).

encontrado que la norepinefrina (NE) interactúa a través de receptores alfa₂ adrenérgicos con las terminales de las interneuronas GABAérgicas que hacen sinapsis axosómicas con las neuronas piramidales. Además, también mediante receptores alfa₂ adrenérgicos la NE actúa sobre las terminales serotoninérgicas que llegan a las dendritas apicales de las células piramidales y, mediante receptores β adrenérgicos, sobre las dendritas apicales de las células piramidales de esta región.

El núcleo central superior y el núcleo del raquí dorsal proyectan aferencias serotoninérgicas hacia esta región y se concentran más en el estrato radiado y lacunoso-molecular, haciendo sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas piramidales y con las aferentes adrenérgicas hacia estas terminales. La serotonina ejerce un efecto inhibitorio tónico sobre las células piramidales.

Por su parte, el área tegmental ventral y la sustancia nigra proyectan terminales dopaminérgicas hacia el estrato oriens produciendo efectos inhibitorios sobre las neuronas piramidales de la región.

En la región CA1 hipocámpica también se han observado terminales de neuronas, probablemente como interneuronas, que contienen encefalinas. Sus terminales se han detectado en los estratos lacunoso-molecular, piramidal, radiado y oriens. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la colecistokina (CCK) han sido detectados en los estratos oriens y radiado; las fibras que los contienen se proyectan desde la amígdala y corteza entorrinal. Las terminales que poseen CCK parecen hacer sinapsis de tipo excitador con las neuronas piramidales.

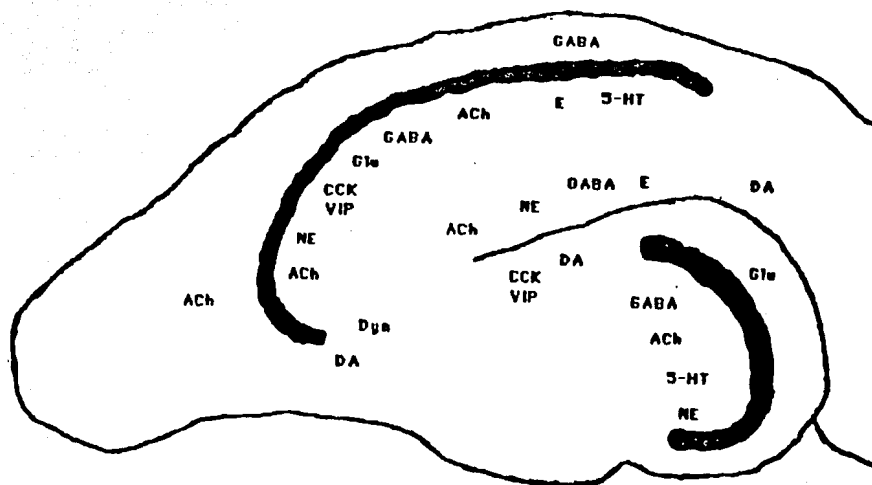


Fig. 5. Esquema de un corte transversal del hipocampo de la rata que muestra los transmisores identificados en esta estructura. Los símbolos son: ACh- acetilcolina; GABA- ácido γ -aminobutírico; Dyn- dinorfina; E- encefalinas; NE- norepinefrina; 5-HT- serotonina; CCK- colecistoquinina; VIP- péptido intestinal vasoactivo; DA- dopamina; Glu- glutamato.

Tomado de Pohorecki y Domino (1987).

y Haas, 1982), y de hipocampo inmaduro (Chesnut y Swan, 1988), así como de generar potenciales postsinápticos inhibitorios en las células piramidales de la región CA1 (Segal, 1987).

De los antecedentes revisados en la sección precedente se concluye que el mecanismo de acción por el cual la 4-aminopiridina ejerce sus diferentes efectos aún no está bien entendido, y que el lograrlo permitirá conocer algunos de los mecanismos de producción de convulsiones. Entre estos mecanismos, y con base en los datos revisados, es posible postular que el efecto de la 4-AP se debe a una acción directa sobre los canales de calcio y sus corrientes en los somas neuronales, particularmente en las regiones cerebrales más epileptogénicas, como el hipocampo. Con esta hipótesis, en el presente trabajo se estudiaron los patrones conductuales y electroencefalograficos inducidos por la administración intrahipocámpica e intraperitoneal de la 4-AP. Además, se estudio el efecto de la dihidropiridina nifedipina como posible antagonista de los efectos provocados por la 4-AP.

VI. MATERIALES Y METODOS.

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 190-327 g de peso. La 4-AP (Sigma) se disolvió en agua destilada. La NF se obtuvo como cápsulas (Adalta, Bayer) cuyo contenido se disolvió en dos volúmenes de Tween 80 (Polyoxyethylene sorbitan mono-oleato, Sigma) al 20% en agua destilada para lograr la concentración deseada. La nisoldipina y nitrendipina fueron obsequiadas por el Dr. A. Scriabine de Miles Laboratories (New Haven, CT, U.S.A.) y se disolvieron primero en la solución placebo del Adalat (60 g glicerina, 100 g agua y 1129 g polietilenglicol) y después en Tween, de manera similar que la NF.

1. Inyección intraperitoneal de la 4-aminopiridina.

La 4-AP se inyectó en la cavidad peritoneal de los animales, sin anestesia previa, en las siguientes dosis : 3, 5, 6 y 7 mg/kg de peso corporal.

2. Administración intrahipocámpica de la 4-aminopiridina.

La rata, anestesiada con halotano, se montó en un aparato estereotáxico Kopf. Con la ayuda de una microjeringa Hamilton de 1 μ l y un microinyector colocado en el propio marco estereotáxico se administró la 4-AP (0.1 μ l, 2.1 nmolas) en el área CA1 del hipocampo derecho. Las coordenadas, de acuerdo al Atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1986), fueron las siguientes : 3.3 mm posterior (P), 2.0 mm lateral (L) y 3.0 mm ventral (V), con respecto al bregma. La solución inyectada contenía disuelto el colorante inerte Azul Directo 15 (Sigma) (6 mg/ml) para la posterior verificación histológica del sitio de

inyección. La administración de dicho colorante por sí mismo no tuvo ningún efecto conductual o electroencefalográfico.

3. Administración de la nifedipina.

La NF se administró por vía subcutánea (s.c.) o intraperitoneal (i.p.) 30 min antes de la aplicación i.p. e intrahipocámpica (i.h.) de la 4-AP. Debido a que la NF es una molécula fotosensible, esta administración se realizó en un cuarto iluminado con luz roja.

En el caso de la administración i.p. de la 4-AP se aplicaron diversas dosis de NF desde 0.1 hasta 50 mg/kg. En los experimentos en los cuales la 4-AP se administró por vía i.h. la única dosis usada de NF fue de 20 mg/kg, aplicada por vía s.c. En experimentos adicionales, se administraron otras DHP, la nisoldipina y la nitrendipina, en dosis de 20 mg/kg.

En todos los experimentos la conducta del animal se observó y/o filmó en videocinta para registrar las conductas presentadas por el animal desde el inicio del tratamiento hasta que los síntomas desaparecían o hasta que el animal moría.

4. Preparación de los animales para su registro electroencefalográfico.

A) Electrodo de profundidad y áreas de registro.

Los animales fueron implantados crónicamente con electrodos bipolares de acero inoxidable recubiertos de teflón (0.2 mm de diámetro) con una superficie de contacto de 0.5 mm y una separación de 0.5 mm entre cada polo. Se colocó el electrodo en la torre estereotáxica que va montada en las barras del aparato y se alineó perfectamente para así asegurar una buena implantación

(fig. 5A). Para el registro de la actividad cortical y de la tierra los electrodos se fabricaron a partir de una punta de aguja de acero inoxidable a la cual se soldó un alambre conductor. Estos electrodos fueron colocados estereotáxicamente en las siguientes estructuras : corteza frontal, amígdala izquierda, hipocampo dorsal derecho y rafe dorsal (CM, AMG, HPC y RD respectivamente).

Para la implantación de los electrodos fueron necesarios los instrumentos para cirugía estereotáxica y el método que se siguió fue el que a continuación se describe :

B) Metodo de implantación.

a) Anestesia.

La dosificación del anestésico se determinó por el peso corporal del animal, el anestésico usado fue ketamina (KETALAR), en dosis de 100 mg/kg, y se administró por vía intramuscular.

b) Montaje del animal en el marco estereotáxico.

Anestesiado el animal se rasuró la parte superior de la cabeza a fin de facilitar la intervención quirúrgica . Se procedio a montarlo en el aparato estereotáxico, introduciendo las puntas de una barra metálica estereotáxica o "lápiz" en cada uno de los conductos auditivos (fig. 5B), y se fijó la parte terminal contraria del lápiz a un tornillo sujetador que se localiza en las barras laterales del aparato. Se tuvo cuidado de que los lápices quedaran equidistantes y que la cabeza del animal no tuviera movimientos laterales (fig. 5C). Por otra parte, para evitar movimientos verticales, se colocó un sostén adicional en el hocico del animal el cual jaló los dientes hacia adelante

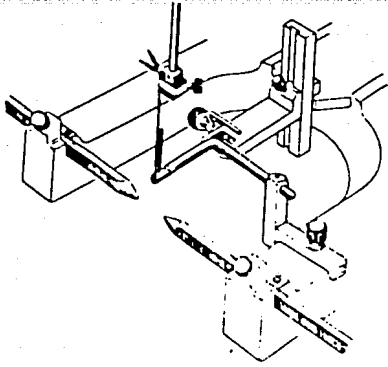
ejercen un efecto hiperpolarizante sobre las neuronas piramidales en CA1.

Con técnicas inmunohistoquímicas se han detectado encefalinas en células con forma piramidal y en algunas interneuronas de esta zona. También se ha visto que péptidos opioides ejercen un efecto excitador sobre las neuronas piramidales (Seifert, 1983; Pohorecki y Domino, 1987; Bayer, 1985; Walaas, 1983).

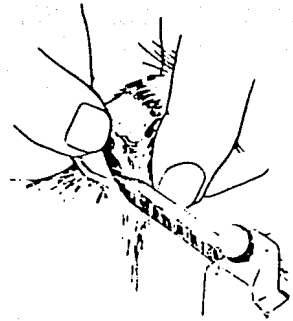
En la figura (4) se puede apreciar un corte del hipocampo de rata en el cual se observa a un modo grueso la regionalización de los transmisores que actúan en la estructura.

4. Efecto de la 4-aminopiridina sobre la región hipocampal.

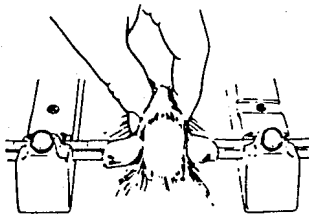
De manera similar a lo observado en médula espinal, se ha demostrado que en rebanadas de hipocampo de rata, la 4-AP es capaz de incrementar tanto los potenciales postsinápticos excitatorios como los inhibitorios (Buckle y Haas, 1982; Lee et al. 1986; Voskul y Albus, 1985). En cultivos de neuronas hipocampales, la 4-AP es capaz de aumentar la amplitud de las espigas de calcio (Segal y Barker, 1986). También se ha demostrado que, a concentraciones μM y en ausencia de estimulación, induce potenciales espontáneos (Buckle y Haas, 1982) en las regiones dendríticas y somáticas de toda la estructura, aunque los más grandes se registran en los estratos piramidal y radial de las regiones CA3 y CA1 (Voskuyl y Albus, 1985). Además, la 4-AP es capaz de inducir actividad epileptiforme en rebanadas de hipocampo de ratas adultas (Buckle



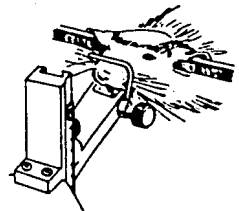
(A)



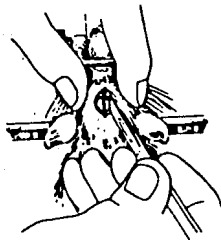
(B)



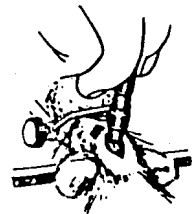
(C)



(D)

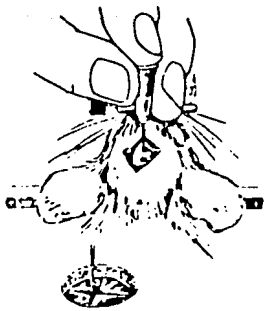


(E)

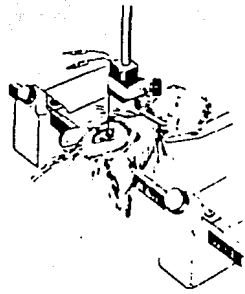


(F)

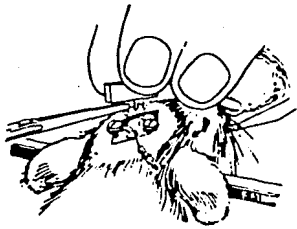
Fig. 6. Metodo de implantación de electrodos para registro de actividad electrica cerebral



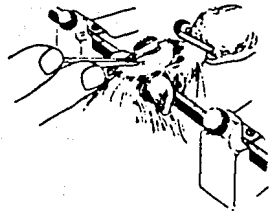
(G)



(H)



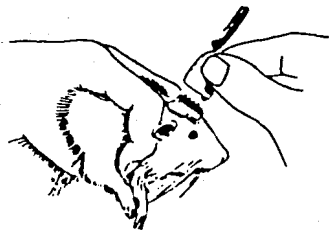
(I)



(J)



(K)



(L)

(fig. 5D). Con todo ello se evitaron movimientos de la cabeza en cualquier sentido.

c) Procedimiento quirúrgico.

La parte dorsal de la cabeza del animal fue anestesiada localmente con XYLOCAINA en aerosol. Se practicó una incisión del cuero cabelludo, en la línea media, de aproximadamente 25 mm de longitud. La piel y el tejido conjuntivo se retiraron hacia un lado de tal forma que el cráneo quedó al descubierto, el área se limpió perfectamente para proceder a resaltar el bregma (intersección de las placas frontal y parietal en su línea media) (fig. 5E) ya que fue a partir de esta referencia de donde se hizo la calibración y posterior localización de las coordenadas. Las coordenadas de cada estructura se tomaron del Atlas estereotáxico de Pellegrino y Cushman (1967) y fueron las siguientes : AMG (P= 0.0 mm, L= 5.0 mm, V= 7.0 mm), HPC (P= 3.2 mm, L= 2.2 mm, V= 2.7 mm), RD (A= 6.0 mm, L= 0.0 mm, V= 6.0 mm) y CX (2.0 mm anterior (A), L= 2.0 mm, V= 1.0 mm).

Encontradas las coordenadas, P o anterior (A) y L totales, se procedió a localizar la V y a realizar un trépano con un taladro dental para cada electrodo (fig. 5F). Realizados éstos, se cortó la duramadre para así permitir el libre tránsito del electrodo hacia la coordenada vertical total (fig. 5G).

Adicionalmente se hicieron dos trépanos más para colocar 2 tornillos de relojero que sirvieron de sostén a toda la estructura.

d) Implantación de los electrodos.

Encontradas las coordenadas totales, se hizo descender el

electrodo por el orificio del trépano en el cráneo, a través de la incisión de la duramadre, hasta la masa cerebral en el punto de la coordenada deseada (fig. 5H).

Todos los elementos mencionados se fijaron con una mezcla de cemento acrílico (PRDALON) que, al endurecer, dejó los electrodos fijos al cráneo, a continuación se retiraron las torres estereotáxicas y se procedió a soldar los alambres terminales a un conector (fig. 5I). Terminado esto último toda la estructura se fijó con el acrílico al cráneo del animal y se protegió con gasa y cinta adhesiva (fig. 5J).

La rata se retiró del aparato y se dejó 7-12 días en recuperación postquirúrgica (fig. 5K) para su posterior tratamiento experimental y registro electroencefalográfico.

e) Registro de la actividad bioeléctrica cerebral.

La actividad eléctrica recogida de las distintas áreas implantadas se amplificó y registró en un polígrafo Grass modelo 78 D al cual llegaron las señales por medio de un sistema de alambres de cobre aislado que se unió al conector de la rata, por un lado (fig. 5L), y a los amplificadores del polígrafo por el otro. En el polígrafo se registró la actividad en papel a una velocidad de 10 mm/seg.

5. Inyecciones intraperitoneales de la 4-aminopiridina en ratas implantadas crónicamente con electrodos.

Se hicieron del mismo modo que en las ratas normales, sólo que en este caso la rata se registró 30 min de actividad eléctrica como control y después se administró la 4-AP para determinar el patrón electroencefalográfico producido por la

droga.

6. Inyección intrahipocámpica en ratas implantadas.

Para aplicar la 4-AP en el HPC fue necesario, con el procedimiento quirúrgico mencionado anteriormente, implantar adicionalmente una cánula de acero inoxidable (calibre 21 y una longitud de 22 mm) que sirvió de guía para introducir la aguja de inyección (calibre 27 y una longitud de 24 mm) hacia la región dorsal del hipocampo. La cánula guía fue sellada con otra cánula, para evitar taponamientos con sangre y tejido, y que se retiraba el día del experimento.

a) Sistema de microinyección.

La aplicación de la 4-AP y del vehículo se realizó utilizando un sistema microinyector constituido por un micrómetro y un sujetador de microjeringa los cuales se montaron en una torre estereotáxica. Con la ayuda de una microjeringa Hamilton de 1 μ l, que se acopló por medio de un tubo de polietileno a la cánula de inyección, se administró la 4-AP o el vehículo durante un periodo de 1-2 min. Esta técnica de inyección es la que se conoce como "inyección en libre movimiento"; esto es, que a la vez que el EEG del animal está siendo registrado, sin anestesia previa, la droga es aplicada.

VII. Análisis histológico.

Con el fin de verificar el sitio de inyección y la localización de los electrodos implantados, el cerebro de las ratas que recibieron la inyección i.h. fue extraído y congelado. En el caso de las ratas que fueron implantadas, fue fijado con

localización de los electrodos implantados, el cerebro de las ratas que recibieron la inyección ih fue extraído y congelado. En el caso de las ratas que fueron implantadas, fue fijado con formol al 10 % mediante perfusión intracardiaca. Al obtenerse el cerebro se hicieron secciones frontales de 40 a 80 μM de grosor, en un crióstato, que sirvieron para corroborar la localización de los electrodos implantados y el sitio de inyección de la droga.

8. Pruebas estadísticas.

Para comprobar los efectos de los diferentes tratamientos experimentales, los datos obtenidos se compararon estadísticamente con la prueba t de Student.

VII.

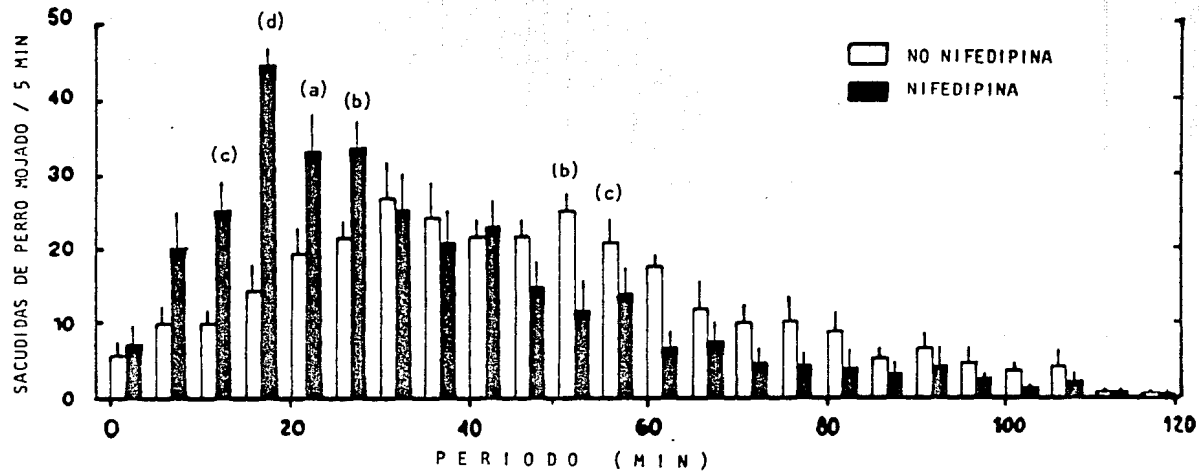
RESULTADOS.

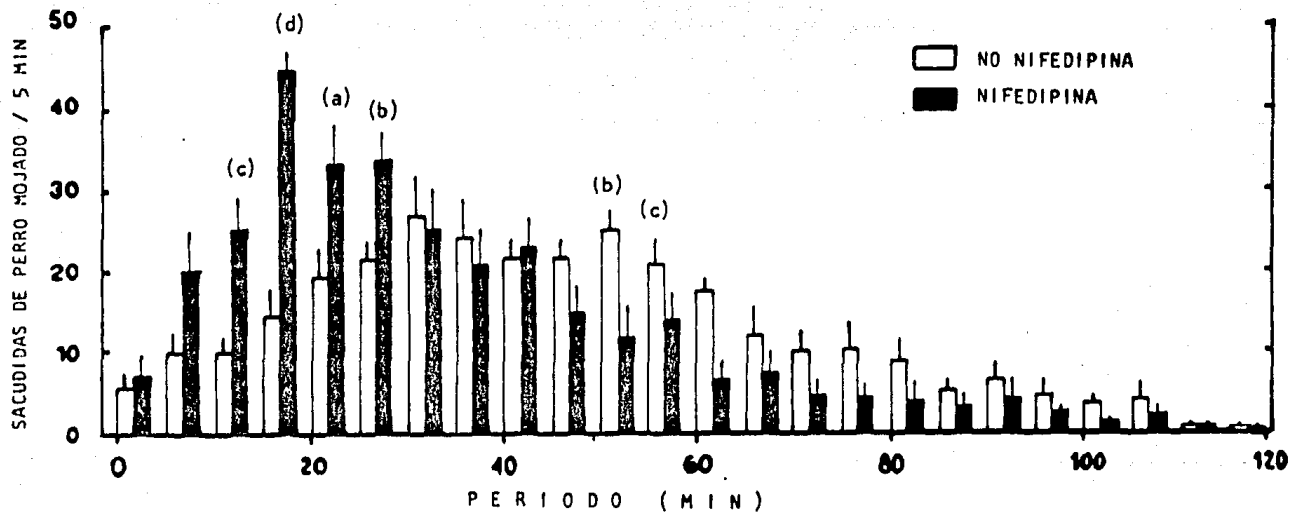
1. Alteraciones motoras inducidas por la administración intrahipocámpica de la 4-AP.

La aplicación de la 4-AP (2.1 nmolas, 0.1 μ l) en la región CA1 del hipocampo de las ratas provocó la aparición de una serie de conductas estereotipadas que en conjunto se denominan "convulsiones límbicas", y que son similares a las presentadas después de la administración i.p. de ácido kainico (Ben-Ari, 1981). Este tipo de convulsiones se caracterizó por la manifestación de diversas conductas como : olfateo, movimientos de vibras y orejas, hiperexcitabilidad, clonías de miembros anteriores, movimientos masticatorios y levantamiento del animal en sus extremidades posteriores. Además se presentó un comportamiento asociado a los anteriores, mucho más evidente y cuantificable. Esta conducta se denomina "sacudidas de perro mojado" (wet-dog shakes), término que hace alusión precisa a la conducta observada.

Todos las conductas mencionadas se presentaron desde el momento en que el animal salió de la anestesia (aproximadamente 20 min). Sin embargo, las sacudidas de perro mojado (SPM) aumentaron paulatinamente en frecuencia hasta alcanzar 162.8 ± 13.5 (M \pm SEM, n=9) en el período de 25-60 minutos después de que el animal salió de la anestesia (fig. 6). Aproximadamente en un lapso de dos horas desde su aparición, todos los comportamientos mencionados desaparecieron y el animal mostró una conducta normal. Con lo anterior, la frecuencia de SPM mostró una distribución en el tiempo en forma de campana.

Fig. 7. Efecto de la nifedipina (20/kg, sc) sobre la frecuencia de SPM inducidas por la administración de 4-AP (2.1 nmolas, 0.1 μ l) en la región CA1 hipocampal. La NF fue administrada 30 min antes de la 4-AP. El tiempo 0 corresponde al momento en que el animal salió de la anestesia. Los valores representados son el promedio de SPM / 5 min \pm el error standard (ES) para 9 (sin NF) y 8 (con NF) ratas. a, P < 0.05; b, P < 0.02; c, P < 0.01; d, P < 0.001 comparado con el correspondiente grupo sin NF.





2. Efecto de la nifedipina sobre las sacudidas de perro mojado provocadas por la inyección intrahipocámpica de la 4-aminopiridina.

La NF (20 mg/kg, sc), aplicada 30 min previos a la 4-AP (2.1 nmolas, 0.1 μ l), potenció los efectos de esta última. En estos experimentos, la potenciación se reflejó en un incremento significativo de la frecuencia de SPM durante los primeros 10 a 30 min (Fig. 7) (31.8 ± 4.2 / 20 min, MIES, n=8 en el grupo con NF, y 15.1 ± 2.3 / 20 min, MIES, n=9 en grupo control). Este aumento en el número de SPM fue sólo temporal ya que no se mantuvo todo el tiempo que las ratas presentaron SPM. Además, es interesante notar que el número total de SPM no tuvo una diferencia significativa comparado con las ratas que no recibieron NF (314.5 ± 45.3 / 120 min, MIES, n=8 en el grupo con NF, y 305.1 ± 32.2 / 120 min, MIES, n=9 en el grupo control).

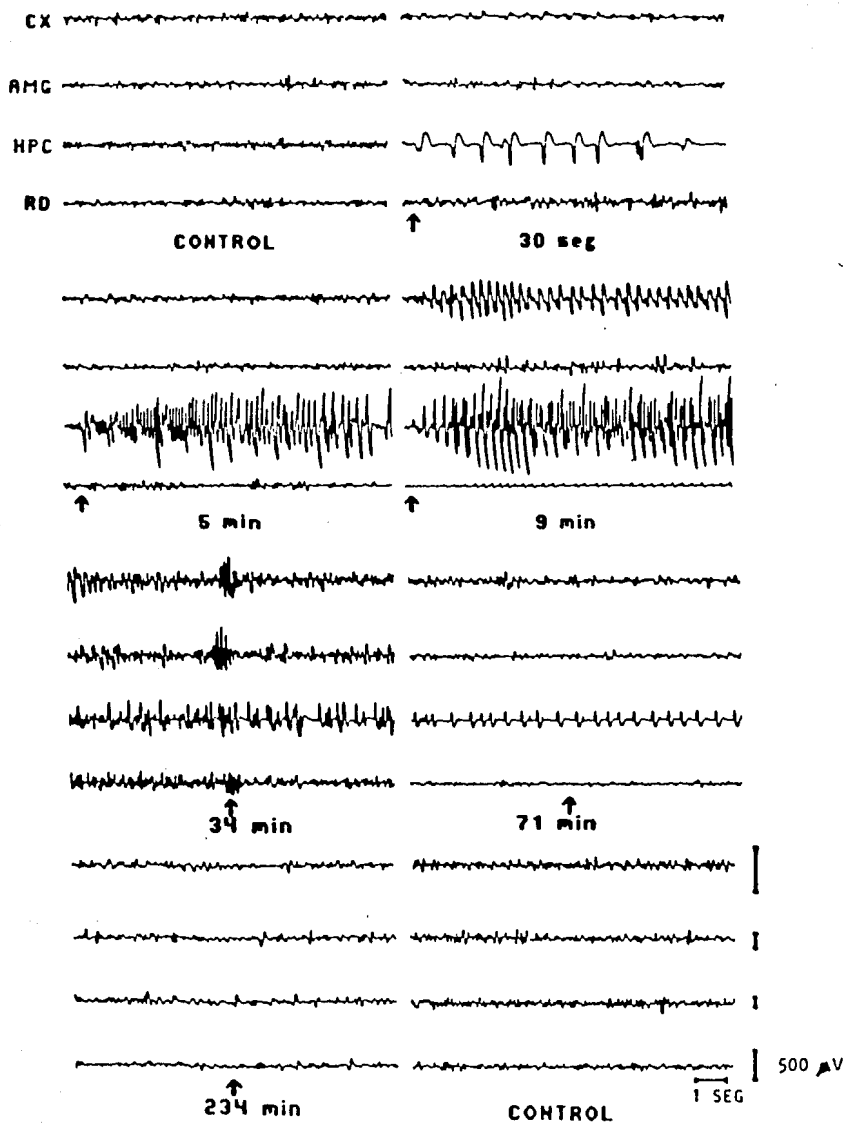
3. Actividad eléctrica epileptiforme asociada con las convulsiones límbicas y las sacudidas de perro mojado.

Antes de mencionar los resultados obtenidos en esta parte, es necesario aclarar que la dosis de 4-AP administrada ih se elevó al doble (4.2 nmolas, 0.2 μ l) ya que, cuando se administró 0.1 μ l no se detectó ninguna respuesta conductual ni electrográfica. Además, al hacer los cortes histológicos, no se observó ninguna tinción. Lo anterior puede deberse a que la resistencia del tubo de polietileno, y en general de todo el sistema de microinyección, impedian que la solución llegara al hipocampo.

Al aplicar la 4-AP en la región dorsal del hipocampo se indujo la aparición de espigas rítmicas (Fig. 8) que se registraron algunos segundos después de iniciarse la

Fig. 8. Registro electroencefalografico que ilustra el efecto de la administración i.v. de la 4-AP (4.2 nmol/kg, 0.2 µl). En esta rata a los 30 seg después de la administración de la droga aparecen las primeras espigas epileptiformes en el hipocampo; a los 9 min, las espigas propagan a corteza; 34 min, generalización de la actividad epileptiforme; 71 min, permanecen espigas continuas solo en el HPC; 234 min, actividad normal similar a la control. En este y en los siguientes registros, las abreviaciones son: CX, corteza frontal izquierda; AMG, amígdala izquierda; HPC; hipocampo dorsal derecho; RP, rafe dorsal.

INYECCION INTRAHIPOCAMPICA DE 4-AP

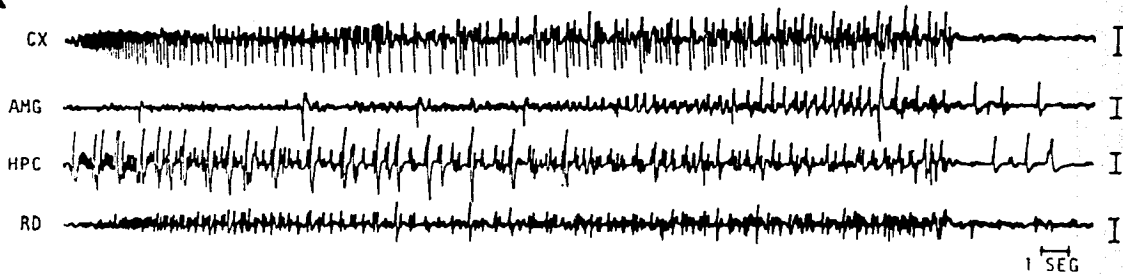
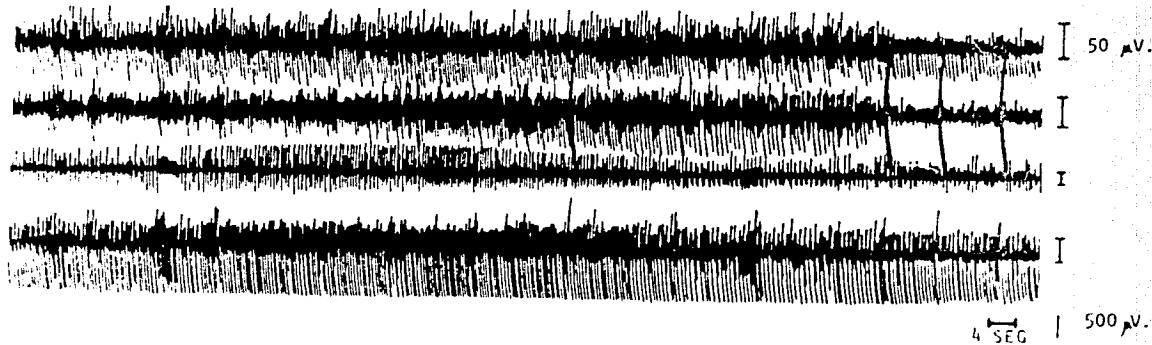


administración (51.0 ± 14.7 seg. MIES, n= 5). Estas espigas paulatinamente comenzaron a aumentar en amplitud y en frecuencia hasta que algunos minutos después comenzaron a propagar hacia otras estructuras registradas (5.5 ± 2.3 min. MIES, n=4). Después de la propagación inicial se observó una generalización de esta actividad hasta llegar a un momento en que todas las estructuras registradas presentaron actividad epileptiforme (16.1 ± 6.5 min. MIES, n=4) después de la aplicación de la droga. La duración promedio de las descargas neuronales fue de aproximadamente 30 seg (Fig. 9A). Finalmente, la actividad epileptiforme comenzó a decrecer en amplitud y en frecuencia en todas las estructuras, excepto en el hipocampo en donde se mantuvo como espigas continuas por aproximadamente 3 hrs desde la administración de la droga, después de este tiempo se alcanzó una actividad electrográfica normal.

4. Modificaciones por la nifedipina de la actividad eléctrica epileptiforme generada por la administración intra-hipocámpica de la 4-aminopiridina.

En las ratas que recibieron un pretratamiento con NF (20 mg/kg, sc), se observó un incremento en la latencia de aparición de las primeras espigas producidas por la aplicación tóptica de la 4-AP (139.6 ± 48.1 seg. MIES, n=6). Estas primeras espigas aparecieron en el HPC, aunque en dos animales se observaron simultáneamente en el RD. Después de algunos minutos, la actividad propagó a otra estructura- sin un orden preferencial- ésto ocurrió a los 4.8 ± 0.6 min (MIES, n=5) y luego generalizó (6.5 ± 1.0 min, MIES, n=6) sin que se observaran diferencias significativas en los tiempos a que ésto ocurrió respecto de las

Fig. 9. Electroencefalograma de una rata que ilustra: A) una descarga neuronal típica inducida por la administración de la 4- AP (4.2 nmolas; 0.2 μ l) en la región CA1 del hipocampo; B) el status epilepticus inducido por el pretratamiento con NF (20 mg/kg, sc)

A**B**

ratas no pretratadas con NF.

Un efecto interesante inducido por la NF la generación de un status epilepticus. Este estado se caracterizó por descargas continuas de muy larga duración con espigas de gran amplitud y frecuencia (Fig. 9B) que se registraron en todas las estructuras. Estas descargas aparecieron desde los 13.0 ± 2.4 min (MIES, n=6) y permanecieron hasta los 92.0 ± 29.9 min (MIES, n=6) después de la aplicación de la 4-AP. Lo anterior se reflejó en un incremento notable del porcentaje de tiempo que las neuronas estuvieron en descarga durante el tiempo total de registro (Tabla 1). Es interesante hacer notar que este status nunca se presentó en las ratas no pretratadas con NF. Además, el tiempo de recuperación de una actividad electrográfica normal también se incrementó (Tabla 1).

TABLA 1

AUMENTO DEL TIEMPO DE DESCARGA NEURONAL INDUCIDO POR LA NIFEDIPINA.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE TIEMPO EN DESCARGA	TIEMPO TOTAL DE REGISTRO (MINUTOS)
4-AP (n=4)	12.6 ± 1.5	71.8 ± 8.8
4-AP + NIFEDIPINA (n=6)	60.6 ± 11.3 (d)	135.8 ± 26.4 (b)

La dosis administrada de 4-AP fue de 4.2 nmolas, 0.2 µl, 1h. A los animales tratados con NF se les administró 20 mg/kg, sc, 30 min antes. Los datos de la primera columna están expresados como los porcentajes del tiempo en descarga, respecto del tiempo total de registro. M ± ES. b, P < 0.02; d < P 0.001.

5. Patrón convulsivo inducido por la administración intraperitoneal de la 4-aminopiridina.

Como ya se había reportado previamente (Fasantes-Morales et al, 1987) la administración ip de la 4-AP, en ratas, induce alteraciones motoras y convulsiones tónicas, clónicas y muerte de los animales.

A la dosis usada en este trabajo (5 mg/kg), las alteraciones motoras fueron hiperexcitabilidad, sacudidas de cabeza, salivación, olfateo, movimientos masticatorios, parpadeo, miclonías corporales y acicalamiento. Estos primeros síntomas, referidos por nosotros como "síntomas preconvulsivos", se presentaron desde los 4.6 ± 0.8 min después de la administración de la droga (M±ES, n=114). Posteriormente, casi el 75 % de los animales presentó convulsión tónica generalizada (CTG) (Tabla 2) aproximadamente 30 min después de la administración de la droga (32.7 ± 7.3 min, M±ES, n=114). El 12 % de los animales tratados con la droga murieron en CTG, el tiempo al que esto ocurrió fue de 41.9 ± 4.7 min (M ± ES, n= 15). En los animales que sobrevivieron, los síntomas desaparecieron aproximadamente 3 hrs después de la administración de la 4-AP y los animales se recuperaron completamente.

6. Efecto de la nifedipina sobre el patrón convulsivo inducidos por la administración intraperitoneal de la 4-AP.

En las ratas tratadas con 4-AP (5 mg/kg, ip), la administración previa de NF, ip ó sc (0.1 a 5.0 mg/kg), no tuvo ningún efecto sobre el patrón convulsivo inducido por la primera. Sin embargo, a dosis mayores (7.5 a 50.0 mg/kg, sc), la NF ejerció un paradójico efecto potenciador, similar al encontrado

TABLA 2. POTENCIACION PROVOCADA POR LAS DIHIDROPIRIDINAS DEL EFECTO CONVULSIVO INDUCIDO POR LA ADMINISTRACION DE LA 4-AMINOPIRIDINA.

TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)	VIA DE ADMINISTRACION	NUMERO TOTAL DE CONVULSIONES TONICO GENERALIZADAS / NUMERO DE RATAS TRATADAS	PORCENTAJE DE RATAS CON CONVULSION TONICO GENERALIZADA	PORCENTAJE DE RATAS MUERTAS EN CONVULSION
4-AP + VEHICULO	-	-	103/119 = 0.8	73.9	12.6
4-AP + NIFEDIPINA	0.1	i.p.	11/15 = 0.7	66.1	20.0
	0.25	i.p.	26/30 = 0.8	70.0	16.0
	0.25	s.c.	15/20 = 0.7	70.0	5.0
	5.0	s.c.	8/7 = 1.1	100	28.5
	7.5	s.c.	16/8 = 2.0	100	75.0
	10.0	s.c.	22/16 = 1.3	100	56.2
	20.0	s.c.	14/8 = 1.7	100	87.5
	50.0	s.c.	7/4 = 1.7	100	75.0
4-AP + NISOLDIPINA	20.0	s.c.	10/6 = 1.6	83.3	83.3
4-AP + NITRENDIPINA	20.0	s.c.	8/5 = 1.6	80.0	60.0

Las dihidropiridinas, NF- nifedipina, NS- nisoldipina, NT- nitrendipina, fueron aplicadas por vía intraperitoneal (ip) o intrahipocámpica (ih) 30 min antes de la 4-AP (5 mg/kg, ip). Los promedios mostrados en la cuarta columna indican el número de convulsiones tónico generalizadas las dos últimas columnas se refieren al número de ratas tratadas en cada grupo.

en las aplicaciones ih de la 4-AP, del patrón convulsivo caracterizado en este trabajo (Tabla 2). Este efecto sinérgico se observó en el número promedio de convulsiones observadas por rata (0.8 en el grupo control y de 1.3 a 2.0 en las pretratadas con NF), en el número de ratas que convulsionaron (aproximadamente 75 % en las controles y 100 % en las tratadas con 5.0 a 50 mg/kg de NF). Sin embargo, el parámetro en que la potenciación fue más evidente fue en el número de ratas que murieron durante la CTG (12 % en las controles y de 56 a 87 % en las pretratadas con NF). El tiempo de muerte tuvo algunas variaciones respecto a las ratas sin pretratamiento ya que en las ratas con NF este tiempo fue de 25 a 70 min, sin embargo, no se observó ninguna relación clara con la dosis administrada.

En otros experimentos se administró NS o NT (20 mg/kg, sc) y se observaron efectos potenciadores similares a los de la NF (Tabla 2).

Es importante señalar que el efecto mencionado fue también observado en ratas que recibieron la 4-AP sólo 15 min después del pretratamiento con NF (20 mg/kg).

Con ninguna de las dosis utilizadas de las DHP, se observó un efecto claro sobre los síntomas preconvulsivos.

7. Actividad eléctrica epileptiforme asociada a las convulsiones tónico generalizadas.

Debe mencionarse que en estos experimentos la dosis de 4-AP se aumentó a 6 mg/kg, ya que la dosis convulsiva en ratas sin implantar (5 mg/kg) no lo fue en las implantadas y aunque los síntomas preconvulsivos sí se observaron, la convulsión tónica generalizada nunca se presentó.

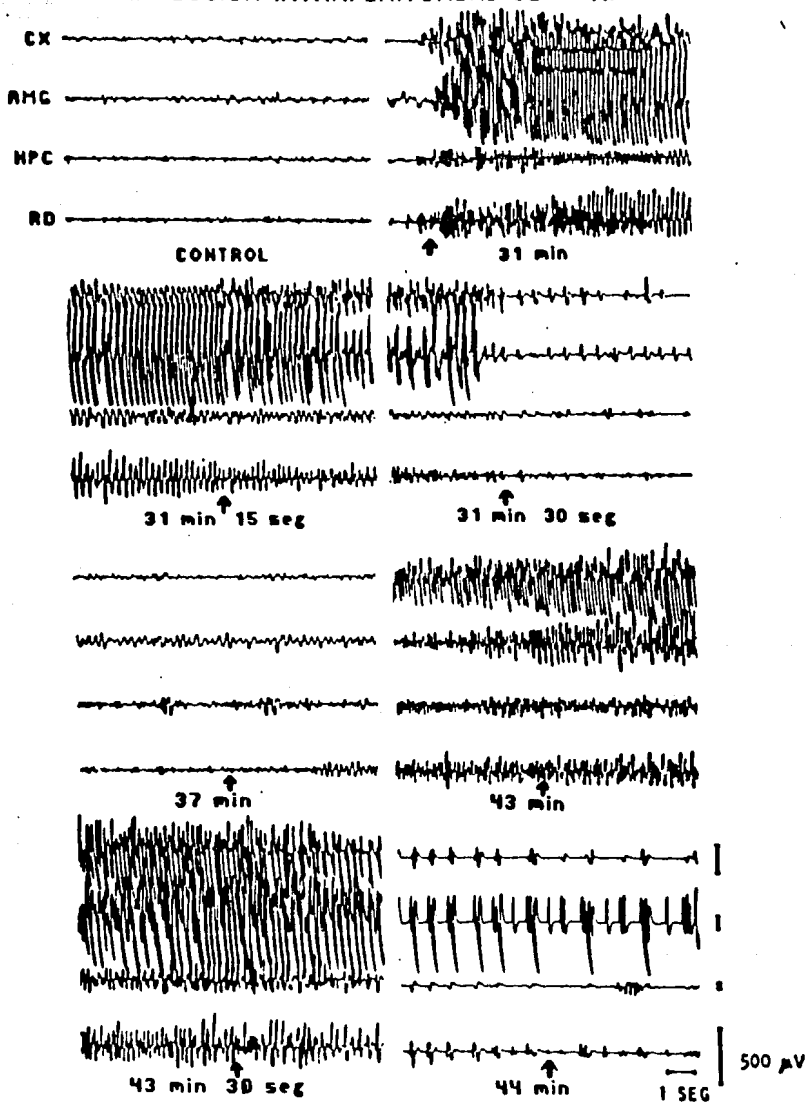
Antes de presentarse la CTG, la administración ip de la 4-AP provocó una variación electrográfica interesante en todas las estructuras registradas, aunque el efecto fue más evidente en HPC. Esta variación consistió en la inducción paulatina de un tipo de actividad eléctrica conocido como ritmo theta- actividad eléctrica cuya frecuencia oscila entre 4 y 8 hertz- la presencia de esta actividad no estuvo relacionada con movimientos o conductas motoras específicas de los animales.

Al momento en que ocurrió la CTG (19.1 ± 3.9 min, M±ES, n=8) se apreció una descarga generalizada que apareció simultáneamente en todas las estructuras registradas (Fig. 10). Como se puede apreciar en la figura, la descarga se compone de una gran variedad de patrones electrográficos, los que incluyen espigas aisladas, poliespigas y complejos punta-onda. La duración de esta descarga fue de 28.2 ± 5.3 seg (M±ES, n=9) a la que siguió un periodo de silencio electrocortical cuya duración fue de 27.2 ± 8.2 seg (M±ES, n=5). Si el animal no moría después de la CTG, la actividad registrada se hallaba muy alterada, ya que en el registro se observaron variaciones, tanto en amplitud como en frecuencia de la actividad, respecto al registro control. Ocasionalmente la rata podía presentar una segunda CTG y, cuando así sucedía, las características de la descarga eran similares a las de la primera (Fig. 10). Después de esta segunda CTG el animal invariablemente moría.

Otros patrones convulsivos inducidos por la 4-AP también se asociaron a una actividad eléctrica epileptiforme. Tal fue el caso de las "crisis de miclonías" las cuales se reflejaron en una serie de espigas de gran amplitud que desaparecían al hacerlo

Fig. 10. Registro electroencefalográfico de una rata que ilustra el efecto de la administración ip de la 4-AP (6 mg/kg). A los 31 min este animal presentó una primera convulsión tónico generalizada (CTG) que se reflejó en la aparición simultánea de actividad eléctrica epileptiforme en todas las estructuras y a los 43 min una segunda CTG, con un patrón bioeléctrico similar, durante la cual el animal murió (44 min).

INYECCION INTRAPERITONEAL DE 4-AP



la conducta.

A pesar de todo, una correlación conducta-actividad eléctrica es difícil, ya que se presentaron casos en los cuales el registro electrográfico se hallaba alterado en forma impresionante y, contra lo esperado, la conducta de la rata era de aparente tranquilidad; además, en otros casos, sucedió lo contrario ya que hubo ocasiones en que la rata se hallaba en CTG y, sin embargo, el registro electrográfico no mostraba las alteraciones del patrón caracterizado en este trabajo.

8. Efecto de la nifedipina sobre la actividad eléctrica epileptiforme asociada a las convulsiones tónico generalizadas.

La aplicación previa de NF, 30 min antes (20 mg/kg, sc), provocó algunos efectos interesantes sobre el patrón electrográfico caracterizado en las ratas tratadas con 4-AP (6 mg/kg, ip).

En primer término se observó que la descarga presentada al momento de la CTG tendió a aumentar su duración, ya que en este caso fue de 47.7 ± 8.78 seg (M±ES, n=9). Sin embargo, las características de los patrones electrográficos registrados al momento de la CTG no se alteraron.

Otro parámetro que también se afectó fue la duración del período silente postconvulsivo, el cual también tendió a aumentar en duración (52.5 ± 7.5 seg, M±ES, n=4).

También se observó una potenciación de los efectos de la 4-AP, ya que el número promedio de convulsiones por rata se incrementó, las ratas presentaron, sin excepción, dos e incluso tres CTG. Sin embargo, en ambos grupos todas las ratas murieron.

VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES

1. Convulsiones límbicas y tónico generalizadas inducidas por la administración intrahipocámpica o intraperitoneal de la 4-AP.

En trabajos anteriores se ha demostrado el efecto facilitador que ejerce la 4-AP sobre la transmisión sináptica, induce una liberación inespecífica y generalizada de los transmisores y, en consecuencia, provoca un aumento tanto de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPES), como de los inhibitorios (PPIS) (Jankowska et al 1977; Galindo y Rudomín, 1978). Por lo anterior, está claro que el efecto convulsivo de la 4-AP no se debe a que provoca fallas en los mecanismos neuronales inhibitorios. Como explicación alternativa, las convulsiones pudieran deberse a un aumento preferencial de la liberación de transmisores excitadores, con el consiguiente desbalance en los mecanismos reguladores. De acuerdo con ésto, se ha reportado que la 4-AP induce un aumento en la liberación de glutamato, un neurotransmisor excitador muy potente, en sinaptosomas de cerebro de ratón (Tapia y Sitges, 1982) y en sinaptosomas de corteza de cuyo (Tibbe et al, 1989).

Apoiando lo anterior, se conocen diversos efectos de la 4-AP que son prevenidos por antagonistas de un tipo de receptor para aminoácidos excitadores. Estos receptores se han dividido en 3 tipos diferentes: para ácido quisquálico, para ácido kainico y para ácido N-metil-D-aspartico (NMDA). En la sinapsis entre las colaterales de Schaffer y las dendritas apicales de las células piramidales de CA1 (Ver figuras 4 y 5) se ha demostrado un componente de excitación mediado por el receptor al NMDA

(Andreasen et al. 1988, Ashton et al. 1988). En esta sinapsis la 4-AP provoca un incremento del 92 % en los PPES (Buckle y Hass, 1982), este incremento es bloqueado por el 2-amino-5-fosfonovalerato (2-APV), un antagonista específico del receptor al NMDA (Lee et al. 1986). Además, en la membrana presináptica de las células del hipocampo, la 4-AP inhibe la fosforilación de la proteína B-50 (De Graan et al. 1987) y el 2-APV antagoniza este efecto, la fosforilación de esta proteína estaría jugando un papel importante en procesos de epileptogénesis (Heemskerk et al. 1987). El 2-APV también revierte la hiperexcitabilidad producida por la 4-AP, cuando ambas drogas son administradas por vía icv (Gandolfo et al. 1989). Los datos anteriores apoyan la idea de que los aminoácidos excitadores juegan un papel fundamental en los efectos convulsivos que produce la 4-AP.

Los efectos de la 4-AP en la homeostasis del calcio, y el consecuente desarrollo de la actividad epiléptica, también podrían explicarse por otros mecanismos. Aunque la entrada de calcio promovida por aminoácidos excitadores parece ocurrir principalmente por el ionóforo acoplado al receptor del NMDA, en neuronas piramidales de rebanadas de hipocampo se ha demostrado que al estimular este receptor se generan corrientes de calcio alternas cuya amplitud es reducida tanto por iones inorgánicos (cobalto y manganeso) como por bloqueadores orgánicos (verapamil y D-600). Esos resultados sugieren que la acción despolarizante del NMDA provoca la activación de una conductancia, sensible al voltaje, al ión calcio (Dingledine, 1983). Además, en los somas de las células piramidales existen "sumideros" al calcio en donde el catión se almacena y puede entrar después de una

despolarización (Manciani et al, 1981). El hecho de que se registren múltiples amplitudes y umbrales de las espigas de calcio implica que la zona de disparo de éstas puede estar distribuida ampliamente sobre la superficie de las neuronas (Dingledine, 1983), además de que en estas neuronas la 4-AP incrementa las corrientes de calcio tanto a nivel presináptico, en el soma de las neuronas piramidales, como postsináptico, en las dendritas (Jones y Heinemann, 1987). También en las dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1 se ha demostrado la existencia de espigas de calcio (Lee et al, 1986; Schwartzkroin y Slawsky, 1977), también se han registrado en dendritas de neuronas talámicas de cuyo (Johansen y Llinás, 1984) y en dendritas de las células de Purkinje de aves (Llinás y Hess, 1976a) y ambas son incrementadas por la 4-AP.

El mecanismo propuesto podría explicar también las CTG observadas al inyectar sistémicamente la 4-AP ya que se ha demostrado que al administrar la 4-AP por vía intravenosa la capa de células piramidales del hipocampo es una de las estructuras cerebrales con mayor número de sitios para su unión (Berger et al, 1989).

Por lo anterior es factible pensar que la 4-AP, además de provocar la liberación preferencial de aminoácidos excitadores, y la consecuente entrada de calcio, también podría estar actuando directamente sobre los CCSV postsinápticos e inducir un influjo del ion. Estos dos mecanismos contribuirían a la creación de un foco epileptogénico que resultaría en la generación de actividad convulsiva.

2. Potenciación por la nifedipina de las convulsiones tónico generalizadas producidas por la 4-AP.

Se sabe que las DHP rápidamente cruzan la barrera HE, de tal manera que, en el cerebro de rata, después de 30 min de su administración intravenosa, se encuentran en prácticamente todas las estructuras cerebrales, de las cuales la corteza y el hipocampo son las que poseen mayor número de sitios de unión para estas moléculas (Schoemaker et al, 1983), además, estos compuestos también se han detectado en las mismas estructuras 15 min después de su administración ip (Supravilai y Karobath, 1984).

Se sabe que en SNC existe una gran cantidad de CCSV que poseen sitios de unión a las DHP. Sin embargo, el papel fisiológico que juegan estos sitios de es poco claro y no se sabe si los sitios de unión realmente representan CCSV funcionales (Thayer et al, 1986). Se ha demostrado que, en sinaptosomas de cerebro completo de ratón, la NT y la NF no afectan la liberación de GABA inducida por potasio o por 4-AP; además, la 4-AP no afecta la unión de la DHP antagonista (+) PN 200-110. De las evidencias mencionadas se ha concluido que el sitio al cual se unen las DHP no interviene en la liberación de transmisores (Massieu y Tapia, 1988).

En virtud de lo anterior, un mecanismo para explicar la potenciación podría ser que en el soma y en las dendritas de las neuronas del hipocampo existen CCSV sensibles a las DHP. Estos canales se han identificado en las neuronas de CA1 (Docherty y Brown, 1986; Bolger et al, 1987) y en las células piramidales de CA3 (Gahwiler y Brown, 1987). Por otra parte, en rebanadas de

corteza de rata, la NF es incapaz de bloquear las corrientes de calcio activadas por el NMDA y, sin embargo, es capaz de provocar un influjo del catión (Riveros y Orrego, 1986), esto puede deberse a un efecto agonista de la droga sobre ciertos canales de calcio. Se han encontrado efectos similares en otros modelos experimentales, como el músculo liso de arteria coronaria de cerdos, en donde la NT (10^{-6} M) estimula la contracción y el influjo de calcio inducido por el (-) BAY K 8644, una dihidropiridina agonista de los CCSV. Sin embargo, al agregarla en dosis mayores (10^{-5} M), la NT inhibe ambos efectos (Miwa y Schwartz, 1987), además se sabe que incrementa las convulsiones clónicas y la mortalidad inducida en ratas por la administración ip del N-metil-DL-aspartato (NMA), esto es interesante porque el mecanismo de acción del NMA es por un incremento en la conductancia al calcio por el ionóforo acoplado a su receptor (Dolin et al, 1988).

Por las evidencias mencionadas, y por el efecto encontrado en este trabajo, es claro que la NF no se comporta solamente como una molécula antagonista de los CCSV, sino que en realidad el compuesto parece comportarse como un "agonista parcial" cuya acción, a nivel celular, estaría induciendo una entrada adicional de calcio a la célula postsináptica, provocando una potenciación de los efectos iniciados por la 4-AP, esto es, de la liberación masiva de transmisores excitadores con la consecuente entrada de calcio por el ionóforo acoplado a los receptores y por la activación de corrientes adicionales. La misma explicación se podría dar a la potenciación producida por la NT y la NM.

En estudios como este, en el que la administración de las DHP fue por vía sistémica, los cambios producidos en la resistencia vascular pudieran estar produciendo o influyendo en los resultados observados. Sin embargo, es difícil pensar que el efecto potenciador de las dihidropiridinas se deba a sus acciones cardiovasculares, ya que una dosis de 100 mg/kg, ip, de NT sólo causa un pequeño decremento en la presión sanguínea de animales no hipertensos (Dolin et al, 1986), además de que es imposible explicar una convulsión sólo por efectos periféricos.

3. Sacudidas de perro mojado provocadas por la aplicación intrahipocámpica de la 4-aminopiridina.

Las SPM se definen como un temblor brusco y generalizado, de corta duración, de la cabeza, el cuello y el tronco. Esta conducta fue descrita por Martin et al, en 1963 (Ohno et al, 1987) al observarla en ratas con abstinencia a morfina. Las SPM han sido descritas como una conducta espontánea o provocada por una serie de estímulos, como el sumergir a las ratas en agua fría o por estimulación táctil de las orejas (Bedard y Fycock, 1977). También pueden ser farmacológicamente inducidas por la inyección sistémica o tópica del factor liberador de la tirotrópina, por estimulación eléctrica de estructuras límbicas como el hipocampo, el septo y el fornix (Ohno et al, 1987), por administración icv de péptidos como las β -endorfinas o las encefalinas, por kindling amigdalino o septal, por epilepsia inducida por cobalto o por electroshock (Yoshida et al, 1986) y por administración ip de ácido kaínico (Ben-Ari et al, 1981). Con base en las evidencias mencionados arriba, es claro que en la aparición de esta conducta están implicados los sistemas serotoninérgicos y peptidérgicos.

además de que las vías noradrenérgicas también pueden (Ohno et al, 1987).

El mecanismo por el cual la 4-AP provocó las SPM es poco claro. Se conoce que en el estrato piramidal de la región CA1 hipocámpica existen vías que funcionan con los transmisores implicados en la generación de esta conducta (Ver introducción), por lo que probablemente la 4-AP esté provocando una liberación de ellas. Por ejemplo, se sabe que, en el hipocampo, la sustancia P tiene un papel regulador sobre los canales de calcio y los flujos de este cation, y además incrementa la unión de DHP antagonistas (Battaini et al, 1987). Además, se sabe que el sistema serotoninérgico ejerce un efecto tónico inhibitorio sobre la actividad epiléptica hipocámpal (Cavalheiro et al, 1981). Es probable que al inducir un foco epileptógeno en el HPC, este sistema inhibitorio aumente su actividad y, tal vez, propicie la aparición de las SPM. El hecho de observar que la actividad eléctrica del raqué dorsal se altera con la administración ih de la 4-AP podría implicar una actividad aumentada de la estructura y una inducción masiva de la liberación de serotonina; sin embargo las alteraciones de los mecanismos serotoninérgicos y peptidérgicos son sólo un ejemplo de las muchas alteraciones neuroquímicas que pueden ocurrir durante la actividad epiléptica.

Puesto que el mecanismo de la inducción de SPM por la 4-AP es poco claro, la disminución en la latencia a las SPM observado en las ratas pretratadas con NF es también difícil de explicar. Dado el efecto de las DHP sobre ciertos canales de calcio, es posible pensar que en esta potenciación participe este cation, mediante el mecanismo postulado.

4. Inducción de la generación de actividad eléctrica epileptiforme.

La aplicación ih de la 4-AP produjo la aparición de actividad epileptiforme en el hipocampo aproximadamente 1 min después de su administración; este resultado es similar al encontrado cuando se registra la actividad eléctrica provocada por la aplicación tópica de aminopiridinas en la corteza de gatos anestesiados (Szente y Pongrácz, 1979).

Las primeras espigas epileptiformes paulatinamente propagan hacia las otras estructuras. Se ha reportado que justo antes del comienzo de la actividad convulsiva hay un incremento en los niveles de potasio y un decremento en la concentración de calcio (Heinemann et al, 1981; Pumain et al, 1983), estas variaciones se han detectado al inducir actividad convulsiva con 4-AP en rebanadas de corteza olfatoria de rata (Galvan et al, 1982) y en la corteza cerebelosa de gatos (Nicholson et al, 1976). Las altas concentraciones de potasio pueden despolarizar elementos tisulares (Van Harrevel, 1984) y, puesto que las neuronas de CA1 están fuertemente empacadas, esta acumulación de potasio en el espacio extracelular puede ser suficiente para excitar a las células contiguas, lo que puede propiciar y contribuir en la propagación de la actividad epileptiforme (Yaari et al, 1983).

El notable aumento en la duración de la descarga neuronal observado al inyectar la 4-AP en ratas pretratadas con NF podría explicarse por un efecto postsináptico agonista y sinérgico por parte de las DHP de la liberación masiva de glutamato causada por la 4-AP, además de una posible inducción adicional de la entrada del catión en la célula postsináptica. El mecanismo sería similar

al propuesto para explicar la potenciación de las CTG por la NF. Esta hipótesis se ve apoyada por la reciente observación de que la NF potencia las convulsiones electrográficas producidas por la administración ih de ácido quinolínic (Vezzani et al, 1988), un compuesto que también estimula al receptor del NMDA.

La inducción paulatina de ritmo theta como única alteración preconvulsiva, principalmente en el hipocampo, resulta interesante. En la generación del ritmo theta juegan un papel fundamental las proyecciones colinérgicas hacia esta estructura. Por lo anterior, la inducción de esta actividad, estaría reflejando una liberación masiva de ACh, que es otro de los transmisores cuya liberación es provocada por la 4-AP tanto en SNC (Tapia y Sitges, 1982; Tapia et al, 1985; Dolezal y Tucek, 1983; Foldes et al, 1988), como en placa neuromuscular (Lundh y Thesleff, 1977; Molgó et al, 1977; Lundh, 1978; Marshall et al, 1979). Este hallazgo amerita muchos más estudios, tanto electroencefalográficos como neuroquímicos.

La tendencia a aumentar el tiempo de descarga de las estructuras neuronales en las ratas pretratadas con NF es el reflejo bioeléctrico del efecto potenciador producido por las DHP y puede ser explicado con el mismo mecanismo.

En base a las evidencias experimentales mencionadas arriba, es factible concluir que los efectos convulsivos inducidos por la 4-AP y el efecto potenciador producido por la 4-AP podrían explicarse como sigue:

- Las convulsiones tónicas generalizadas y límbicas inducidas por la 4-aminopiridina podrían deberse a un aumento preferencial de la transmisión excitatoria (aminoácidos

excitadores).

- La inducción de corrientes entrantes de calcio en las células postsinápticas también podría estar contribuyendo a la generación de un foco epileptógeno.
- El mecanismo por el cual se producen las sacudidas de perro es poco claro, podría deberse a un incremento masivo de la liberación de los transmisores involucrados en la generación de esta conducta (serotonina, opiáceos, noradrenalina) o a un mecanismo inhibitorio compensatorio de la sobreexcitación producida por los aminoácidos excitadores.
- El efecto potenciador inducido por las dihidropiridinas podría atribuirse a un efecto directo sobre los canales de calcio sensibles a voltaje postsinápticos, sobre los cuales actuaría como un agonista, por lo que a estas moléculas se les podría considerar como "agonistas parciales".

VIII.

REFERENCIAS

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. D. (1983) Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York & London. 1146 p.
- Alnaes, E. y Rahamimoff, R. 1975, On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. J. Physiol. 248, 285-306.
- Agoston, S., Salt, P.J., Erdmann, W., Hilkemeijer, T., Bencini, A. y Langwehr, D. 1980, Antagonism of ketamine-diazepam anaesthesia by 4-aminopyridine in human volunteers. Br. J. Anaest. 52, 367-370.
- Andreasen, M., Lambert, J. D. C. y Skovgaard J. M., 1988, Direct demonstration of an N-methyl-D-aspartate receptor mediated component of excitatory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. Neurosci. Lett. 93, 61-66.
- Arzate, M. E., Morán, J. y Pasantes-Morales, H. 1986, Inhibitory effect of taurine on 4-aminopyridine-stimulated release of labelled dopamine from striatal synaptosomes. Neuropharmacology. 25 (7), 689-694.
- Arzate, M. E., Ponce, H. y Pasantes-Morales, H. 1984, Antagonistic effects of taurine and 4-aminopyridine on Guinea Pig ileum. J. Neurosci. Res. 11, 271-280.
- Ashton, D., Willems, R., De Prins, E. y Wauquier, A. 1988, Selective inhibition of synaptic versus non-synaptic

by NMDA antagonists in the in vitro hippocampus. *Epilepsy Res.* 2, 219-222.

Battaini, F., Govoni, S., Del Vesco, R., Di Giovine, S. y Trabucchi, M., 1987, Concomitant regulation of hippocampal calcium antagonist receptors and calcium uptake by substance P., *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 144 (3), 1135-1142.

Bayer, S. A., 1985, Hippocampal region. En: *The rat nervous system*. Edit. by Academic Press Australia. 335-348.

Bedard, P. y Pycocock, C. J., 1977, "Wet-dog" shake behavior in the rat: a possible quantitative model of central 5-hydroxytryptamine activity., *Neuropharmacology*. 16, 663-670.

Ben-Ari, Y., Trembley, E., Riche, D., Ghilini, G., y Naquet, R., 1981, Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience*. 6: 1361-1391.

Berger, S. G., Waser, P.G. y Sin-Ren, Ch., 1989, Distribution of the 4-aminopyridine derivate 3-methoxy-4-aminopyridine in mice., *Neuropharmacology*. 28 (2), 191-194.

Biessels, P. T. M., Agoston, S. y Horn, A. S., 1985, Comparasion of the pharmacological actions of some new 4-aminopyridine derivatives., *Eur. J. Pharmacol.* 106, 319-325.

Blaustein, M. P., 1988, Calcium transport and buffering in neurons., *TINS*. 11 (10), 438-443.

Bolger, G. T., Basile, A. S., Janowsky, A. J., Paul, S. M. y Skolnick, P., 1987, Regulation of dihydropyridine calcium antagonist binding sites in the rat hippocampus following neurochemical lesions., *J. Neurosc. Res.* 17, 285-290.

Bondy, C. A. y Russell, J. T., 1988, Dendrotoxin and 4-aminopyridine potentiate neurohypophysial hormone secretion during low frequency electrical stimulation., *Brain Res.* 453, 397-400.

Bonilla, E. R., Bases moleculares de la neurotransmisión, Maracaibo, Venezuela. Astra Data. 486 p.

Boschero, A. C., Reis, L. C., Dias, O., Delattre, E. y Goncalves, A. A., 1987, Cation transport by pancreatic β -cells: effect of 4-aminopyridine on $^{86}Rb^{+}$ and $^{45}Ca^{2+}$ Fluxes., *Quarterly J. Exp. Physiol.* 72, 453-460.

Bostock, H., Sears, T. A. y Sherratt, R. M., 1981, The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ions on normal and demyelinated mammalian nerve fibres., *J. Physiol.* 313, 301-315.

Buckle, P. J. y Haas, H.L., 1982, Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat., *J. Physiol.* 326, 109-122.

Burley, E. S. y Jacobs, R. S., 1981, Effects of 4-aminopyridine

on nerve terminal action potentials., J. Pharmacol. Exp. Ther. 219 (1), 268-273.

Cavalheiro, E. A., Elisabetsky, E. y Campos, C. J. R., 1981, Effect of brain serotonin level on induced hippocampal paroxysmal activity in rats., Pharmacol. Bioch. Behavior. 15, 363-366.

Chesnut, T. J. y Swann, J. W., 1988, Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in immature hippocampus., Epilepsy Res. 2, 187-195.

Czyrak, A., Mogilnicka, E. y Maj, J., 1989, Dihydropyridine calcium channel antagonists as antidepressant drugs in mice and rats., Neuropharmacology. 28 (3), 299-233.

Damsma, G., Biessels, P. T. M., Westerink, B. H. C., De Vries, J. and Horn, A. S., 1988, Differential effects of 4-aminopyridine and 2,4- diaminopyridine on the in vivo release of acetylcholine and dopamine in freely moving rats measured by intrastriatal dialysis., European J. Pharmacol. 145, 15-20.

Davidson, M., Zemishlany, Z., Mohs, R. C., Horvath, T. B., Powchik, P., Blass, J. B. y Davis, K. L., 1988, 4-aminopyridine in the treatment of Alzheimer's Disease., Biol. Psychiatry. 23, 485-490.

De Graan, P. N. E., Schrama, L. H., Brussaard, A. B., Jork, R. and Gispen, W. H., 1987, 4-aminopyridine affects

synaptosomal protein phosphorylation in rat hippocampal slices., Brain Res. 404, 345-349.

Den Hertog, A., Biessels, P., Akker, J. V., Agoston, S. y Horn, A. S., 1987. The action of some new aminopyridines on mammalian non-myelinated nerve fibres., Eur. J. Pharmacol. 142, 115-120.

Dingledine, R., 1983, N-Methyl aspartate activates voltage-dependent calcium conductance in rat hippocampal pyramidal cells., J. Physiol. 343, 385-405.

Docherty, R. J. y Brown, D. A., 1986, Interaction of 1,4-dihydropyridines with somatic Ca currents in hippocampal CA1 neurones of the guinea pig in vitro., Neurosc. Lett. 70, 110-115.

Dolezal, V. y Tucek, S., 1983, The effects of 4-aminopyridine and tetrodotoxin on the release of acetylcholine from rat striatal slices., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 323, 90-95.

Dolin, S. J., Hunter, A. B., Halsey, M. J. y Little, H. J., 1988, Anticonvulsant profile of the dihydropyridine calcium channel antagonists, nitrendipine and nimodipine., European J. Pharmacol. 152, 19-27.

Eccles, J., 1982, The synapse: From electrical to chemical transmission., Ann. Rev. Neurosc. 5, 325-339.

Foldes, F. F., Ludvig, N., Nagashima, H. y Vizi, E. S., 1988,

The influence of aminopyridines on Ca²⁺-dependent evoked release of acetylcholine from rat cortex slices., Neuroch.

Res. 13 (2), 761-764.

Gähwiler, B. H. y Brown, D. A., 1987. Effects of dihydropyridine on calcium currents in CA3 pyramidal cells in slice of rat hippocampus., Neuroscience, 3, 731-738.

Galindo, J. y Rudomin, P., 1978. Facilitation of synaptic activity in the frog spinal cord produced by 4-aminopyridine., Neurosc. Lett. 10, 299-304.

Galvan, M., Grafe, P. y Bruggencate, G. T., 1980. Presynaptic actions of 4-aminopyridine and γ -aminobutyric acid on rat sympathetic ganglia in vitro., Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 314, 141-147.

Galvan, M., Grafe, P. y Bruggencate, G. T., 1982. Convulsant actions of 4-aminopyridine on the guinea-pig olfactory cortex., Brain Res. 241, 75-86.

Gandolfo, G., Gottesman, C., Bidard, J. N. y Lazdunski, M., 1989. Ca channel blockers prevent seizures induced by a class of K channel inhibitors., Eur. J. Pharmacol. 160, 173-177.

Gredal, O., Drejer, J. y Honoré, T., 1987. Different target sizes of the voltage-dependent Ca²⁺ channel and the [³H]nitrendipine binding site in rat brain. European J. Pharmacol. 136, 75-80.

Heemskerk, F., Schrama, L., De Graan, P. y Gispen, W., 1987. 4-aminopyridine inhibits synaptosomal plasma membrane

- protein phosphorylation in vitro: effect of the selective NMDA-anatagonist 2-amino-5-phosphonovalerate., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1, 94-99.
- Heinemann, U., Konnerth, A. y Lux, H. D., 1981, Stimulation induced changes in extracellular free calcium in normal cortex and chronic alumina cream foci of cats., Brain Res. 213, 246-250.
- Heuser, J. T. y Reese, T. S., 1981, Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction., J. Cell Biol. 88, 564-580.
- Hinrichsen, R. y Schultz, J., 1988, Paramecium: a model system for the study of excitable cells., TINS. 11, 27-32.
- Ikemoto, Y., Akaike, N. y Ono, K., 1987, 4-aminopyridine activates a cholinergic chloride conductance in isolated Helix neurons., Neurosc. Lett. 76, 42-46.
- Jahnsen, H. y Llinás, R., 1984, Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an *in vitro* study., J. Physiol. 349, 205-226.
- Jankowska, E., Lundberg, A., Rudomin, P. y Sykova, E., 1977, Effects of 4-aminopyridine on transmission in excitatory and inhibitory synapses in the spinal cord., Brain Res. 136, 387-392.
- Jones, R. y Heinemann, U., 1987, Pre- and postsynaptic K and

Ca fluxes in area CA1 of the rat hippocampus in vitro: effects of Ni, TEA and 4-AP., *Exp. Brain Res.* 68, 205-209.

Jones, R. E., Heron, J. R., Foster, D. H., Snelgar, R. S. y Mason, R. J., 1983, Effects of 4-aminopyridine in patients with multiple sclerosis., *J. Neurol. Sciences.* 60, 353-362.

Katz, B. y Miledi, R., 1969, Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer., *J. Physiol.* 203, 689-706.

Kelly, R., 1988, The cell biology of the nerve terminal., *Neuron.* 1, 431-438.

Kirperkar, M., Kirperkar, S. M. y Prat, J. C., Effect of 4-aminopyridine on release of noradrenaline from the perfused cat spleen by nerve stimulation., *J. Physiol.* 272, 517-528.

Kita, T., Kita, H. y Kitai, S. T., 1985, Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation., *Brain Res.* 361, 10-18.

Kubo, S. H., Olivari, M. T. y Cohn, J. N., Calcium antagonists in heart failure. En: Calcium antagonists, Pharmacology and clinical research. Edit. por Vanhoutte, P. M., Paoletti, R. y Govoni, S. The New York Academy of Sciences, New York, 720-722.

Landis, D., Hall, A., Weinstein, L. y Reese, T., 1988, The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse., *Neuron.* 1, 201-209.

Landon, E. J., Surber, M. y Rama, S. V., 1985, Dihydropyridine calcium channel blocking agents in hepatotoxic and ethanol-induced liver cell injury. En: Calcium antagonists. Pharmacology and clinical research. Edit. por Vanhoutte, P. M., Paoletti, R. y Govoni, S. The New York Academy of Sciences. New York, 553-564.

Leander, S., Arner, A. y Johansson, B., 1977, Effects of 4-aminopyridine on mechanical activity and noradrenaline release in the rat portal vein in vitro., Eur. J. Pharmacol. 46, 351-361.

Lee, W. L., Anwyl, R. y Rowan, M., 1986, 4-aminopyridine-mediated increase in long-term potentiation in CA1 of the rat hippocampus., Neurosci. Lett. 70, 106-109.

Lejmeignan, M., Millart, H., Lamiable, D., Molgo, J. y Lechat, P., 1984, Evaluation of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine penetrability into cerebrospinal fluid in anesthetized rats., Brain Res. 304, 166-169.

Llinás, R., Blinks, J. R. y Nicholson, C., 1972, Calcium transient in presynaptic terminal of squid giant synapse: detection with Aequorin., Science. 176, 1127-1129.

Llinás, R. y Hess, R., 1976a, Tetrodotoxin-resistant dendritic spikes in avian Purkinje cells., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 (7), 2520-2523.

Llinás, R., Walton, K. y Bohr, V., 1976b, Synaptic transmission in

- squid giant synapse after potassium conductance blockage with external 3- and 4-aminopyridine., *Biphsy. J.* 16, 83-86.
- Lundh, H., 1978, Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission., *Brain Res.* 153, 307-318.
- Lundh, H., Nilsson, O. y Rosén, I., 1979, Effects of 4-aminopyridine in myasthenia gravis., *J. Neurol. Neurosur. Psychiatry.* 42, 171-175.
- Lundh, H., Nilsson, O. y Rosén, I., 1977, 4-aminopyridine- a new drug tested in the treatment of Eaton-Lambert syndrome., *J. Neurol. Neurosur. Psychiatry.* 40, 1109-1112.
- Lundh, H. y Thesleff, S., 1977, The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals., *Eur. J. Pharmacol.* 42, 411-412.
- Marciani, M. G., Louvel, J. y Heinemann, U., 1981, Aspartate-induced changes in extracellular free calcium in 'in vitro' hippocampal slices of rats., *Brain Res.* 238, 272-277.
- Marshall, I. G., Lambert, J. J. y Durant, N. N., 1979, Inhibition of aminopyridine-induced activity in skeletal muscle by tetrodotoxin and by magnesium., *European J. Pharmacol.* 54, 9-14.
- Massieu, L. y Tapia, R., 1988, Relationship of dihydropyridine binding sites with calcium-dependent neurotransmitter release in synaptosomes., *J. Neurochem.* 51, 1184-1189.

- Meves, H. y Pichon Y., 1977, The effect of internal and external 4-aminopyridine on the potassium currents in intracellularly perfused squid giant axons., *J. Physiol.* 268, 511-532.
- Meyer, F. B., Anderson, R. E., Sundt, T. M. y Sharbrough, F. W., 1986a, Selective central nervous calcium channel blockers-a new class of anticonvulsant agents., *Mayo Clin. Proc.* 61, 239-247.
- Meyer, F. B., Tally, P. W., Anderson, R. E., Sundt, T. M., Yaksh, T. L. y Sharbrough, F. W., 1986b, Inhibition of electrically induced seizures by a dihydropyridine calcium channel blocker., *Brain Res.* 384, 180-183.
- Meyer, F. B., Anderson, R. E., Sundt, T. M., Yaksh, T. L. y Sharbrough, F. W., 1987, Suppression of pentylenetetrazole seizures by oral administration of a dihydropyridine Ca^{2+} antagonist., *Epilepsia.* 28 (4), 409-414.
- Miledi, R., 1973, Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals., *Proc. R. Soc. B.* 183, 421-425.
- Miwa, K. y Schwartz, A., 1987, Paradoxical augmentation of (-)BAY K 8644-induced calcium influx by nitrendipine., *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 148 (1), 1-18.
- Mogilnicka, E., Czyrak, A. y Maj, J., 1987, Dihydropyridine calcium channel antagonists reduce immobility in the mouse behavioral despair test; antidepressants facilitate

nifedipine action., *Eur. J. Pharmacol.* 138, 413-416.

Molgó, J., Lemaignan, M. y Lechat, P., 1977, Effects of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 203 (2), 653-663.

Molgó, J., 1977, Voltage-clamp analysis of the sodium and potassium currents in skeletal muscle fibres treated with 4-aminopyridine., *Experientia*, 34 (10), 1275-1277.

Molgó, J., Lemaignan, M. y Lechat, P., 1979, Analysis of the action of 4-aminopyridine during repetitive stimulation at the neuromuscular junction., *Eur. J. Pharmacol.* 53, 307-311.

Morocutti, C., Pierelli, F., Sanarelli, L., Stefano, E., Peppe, A. y Mattioli, G. L., 1986, Antiepileptic effects of a calcium antagonist (Nimodipine) on Defazolin-induced epileptogenic foci in rabbits., *Epilepsia*, 27 (5), 498-503.

Murray, N. M. F. y Newsom-Davis, J., 1981, Treatment with oral 4-aminopyridine in disorders of neuromuscular transmission., *Neurology*, 31, 265-271.

Nahas, G., Trouvé, R., Latour, C., Sitbon, M. y Demus, J. F., 1988. En: Calcium antagonists. Pharmacology and clinical research. Edit. por Vanhoutte, P. M., Paoletti, R. y Govoni, S. The New York Academy of Sciences. New York, 796-798

Narahashi, T., 1974, Chemicals as tools in the study of excitable membranes., *Physiol. Rev.* 54 (4), 813-889.

- Nicholson, C., Steinberg, R., Stöckle, H. y Bruggencate, G. T., 1976, Calcium decrease associated with aminopyridine-induced potassium increase in cat cerebellum., *Neurosc. Lett.* 3, 315-319.
- Ohno, M., Yamamoto, T. y Ueki, S., 1987, Clonidine attenuates wet-dog shaking induced by hippocampal stimulation in rats., *European J. Pharmacol.* 137, 161-166.
- Olesen, J., 1988, Calcium entry blockers in the prophylaxis of migraine. En: Calcium antagonists. Pharmacology and clinical research. Edit. por Vanhoutte, P. M., Paoletti, R. y Govoni, S. The New York Academy of Sciences. New York, 720-722.
- Parducz, A., Dunant, Y., Loctin, F., Müller, D. y Garcia-Segura, L. M., 1987, Presynaptic effects of 4-aminopyridine and changes following a single giant impulse at the Torpedo nerve-electroplaque junction., *Neuroscience*, 22 (2), 709-718.
- Pasantes-Morales, H. y Arzate, M.E., 1981, Effect of taurine on seizures induced by 4-aminopyridine., *J. Neurosci. Res.* 6, 465-474.
- Pasantes-Morales, H., Arzate, M. E., Quesada, O. y Huxtable, R. J., 1987, Higher susceptibility of taurine-deficient rats to seizures induced by 4-aminopyridine., *Neuropharmacology*, 26 (12), 1721-1725.

Paxinos, G. y Watson, C., 1986, The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York.

Pellegrino, L. J. y Cushman, A. J., A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain. New York. Appleton Century-Crofts, 1967.

Pohorecki, R. y Domino, E. F., 1987, Synaptic Pharmacology of the hippocampus., Rev. Clin. Basic Pharmacol. 6, 189-211.

Pumain, R., Kurcewicz, I. y Louvel, J., 1983, Fast extracellular calcium transients: involvement in epileptic processes., Science, 222, 177-179.

Reuter, H., Porzig, H., Kokubun, S. y Prod'hom, B., 1985, 1,4-dihydropyridines as tools in the study of Ca^{2+} channels., TINS, 396-400.

Riveros, N. y Orrego, F., 1986, N-Methylaspartate-activated calcium channels in rat brain cortex slices. Effect of calcium channel blockers and of inhibitory and depressant substances., Neuroscience, 17 (3), 541-546.

Rogawski, M. A. y Barker, J. L., 1983, Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons., Brain Res. 280, 180-185.

Roth, J., LeRoith, D., Shiloach, J., Rosenzweig, J., Lesniak, M. and Havrankova, J., Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital. Boston, 9, Bleich, H, Boston, 1982, 523-527.

Rubin, R. P., 1974, Calcium and the secretory process. Plenum

Press. New York.

- Sandoval, M., 1980, Studies on the relationship between Ca efflux from mitochondria and the release of amino acid neurotransmitters., *Brain Res.* 181, 357-367.
- Schafer, E. W., Brunton, R. B. y Cunningham, D. J., 1973, A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridine to birds and mammals., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 26, 532-538.
- Schramm, M., Thomas, G., Towart, R. y Franckowiak, G., 1983, Activation of calcium channels by novel 1,4-dihydropyridines. A new mechanism for positive inotropics or smooth muscle stimulants., *Arzneim.-Forsch. Drug Res.* 33 (II), 9, 1268-1272.
- Schwartzkroin, P. A., 1977, Further characteristics of hippocampal CA1 cells in vitro., *Brain Res.* 128, 53-68.
- Segal, M., 1987, Repetitive inhibitory postsynaptic potentials evoked by 4-aminopyridine in hippocampal neurons in vitro., *Brain Res.* 41, 285-293.
- Segal, M. y Barker, J. L., 1986, Rat hippocampal neurons in culture: Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent K^{+} conductances., *J. Neurophysiol.* 55 (4), 751-766.
- Seifert, W. 1983, *Neurobiology of the hippocampus.* Academic Press, London.
- Shelton, R. C., Grebb, J. A. y Freed, W. J., 1987, Induction of

seizures in mice by intracerebroventricular administration of the calcium channel agonist BAY k 8644., Brain Res. 402, 399-402.

Snyder, S. H., Base molecular de la comunicación intercelular. En Las moléculas de la Vida. Investigación y Ciencia. 110-111 P.

Spyker, D. A., Lynch, C. L., Shabanowitz, J. y Sinn, J. A., 1980, Poisoning with 4-aminopyridine: Report of three cases, Clin. Toxicol. 16 (4), 487-497.

Supavilai, P. y Karobath, M., 1984, The interaction of [³H]PY 108-068 and of [³H]PN 200-110 with calcium channel binding sites in rat brain., J. Neural Transmission. 60, 149-167.

Szente, M. y Pongrácz, F., 1979, Aminopyridine-induced seizure activity., Electroencephalography and Clinical Neurophysiology. 46, 605-608.

Tapia, R., 1982, Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in mice by 4-aminopyridine, guanidine and lanthanum., Neurosc. Lett. 30, 73-77.

Tapia, R. y Sitges, M., 1982, Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes., Brain Res. 250, 291-299.

Tapia, R., Sitges, M. y Morales, E., 1985, Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes., Brain Res. 361, 373-382.

- Thayer, S. A., Murphy, S. N., Miller, R. J., 1986, Widespread distribution of dihydropyridine-sensitive calcium channels in the central nervous system., *Mol. Pharmacol.* 30, 505-509.
- Thesleff, S., 1980, Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience.* 5, 1413-1419.
- Thompson, S., 1982, Aminopyridine block of transient potassium current., *J. Gen. Physiol.* 80, 1-18.
- Thornley, R. H. y Wilson, D. F., 1983, Effects of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine on transmitter release at the neuromuscular junction., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227, 260-265.
- Thurman, R. G., Apel, E., Badr, M. y Lemasters, L., 1988. En: Calcium antagonists. Pharmacology and clinical research. Edit. por Vanhoutte, P. M., Paoletti, R. y Govoni, S. The New York Academy of Sciences. New York, 720-722.
- Tibbs, G. R., Dolly, J. O. y Nicholls, D. G., 1989, Dendrotoxin, 4-aminopyridine, and β -Bungarotoxin act at common loci but by two distinct mechanisms to induce Ca^{2+} -dependent release of glutamate from Guinea-Pig cerebrocortical synaptosomes., *J. Neurochem.* 52, 201-206.
- Tokunaga, A., Sandri, C. y Akert, K., 1979a, Ultrastructural effects of 4-aminopyridine on the presynaptic membrane in the rat spinal cord., *Brain Res.* 163, 1-8.
- Tokunaga, A., Sandri, C. y Akert, K., 1979b, Increase of large

intramembranous particles in the presynaptic active zone after administration of 4-aminopyridine., Brain Res. 174, 207-219.

Uges, D. R. A., Sohn, Y. J., Greijdanus, B., Scaf, A. H. J. y Agoston, S., 1982, 4-aminopyridine kinetics., Clin. Pharmacol. Ther. 31, 587-593.

Van H. A., 1984, Effects of 4-aminopyridine on the field potentials of hippocampal slices., Neurosc. Lett. 50, 283-287.

Vezzani, A., Wu, H. Q., Stasi, M. A., Angelico, P. y Samanin, R., 1988, Effect of various calcium channel blockers on three different models of limbic seizures in rats., Neuropharmacology. 27 (5), 451-458.

Vital Brazil, O., Fontana, M. D. y Pavana, N., J. P., 1989, Effect of 4-aminopyridine on the postsynaptic action of polymyxin B., Eur. J. Pharmacol. 159, 47-51.

Vizi, E. S., Dijk, J. V. y Foldes, F. F., 1977, The effect of 4-aminopyridine on acetylcholine release., J. Neural Transmission. 41, 265-274.

Voskuyl, R. A. y Albus, H., 1985, Spontaneous epileptiform discharges in hippocampal slices induced by 4-aminopyridine., Brain Res. 342, 54-66.

Walaas, I., 1983, The hippocampus. En: Chemical Neuroanatomy. Edit. por Emson P. C., Raven Press, New York.

Wesseling, H., Agoston, S., Van Dam, G. B. F., Pasma, G., DeWit, D.J. y Havinga, H., 1984, Effects of 4-aminopyridine in elderly patients with Alzheimer's Disease., N. Engl. J. Med. 310, 988-989.

Yaari, Y., Konnerth, A. y Heinemann, U., 1983, Spontaneous epileptiform activity CA1 hippocampal neurons in low extracellular calcium solutions., Exp. Brain Res. 51, 153-156.

Yeh, J. Z., Oxford, G. S., Wu, C. H. y Narahashi, T., 1976a, Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes., Biophys. J. 16, 77-81.

Yeh, J. Z., Oxford, G. S., Wu, C.H. y Narahashi, T., 1976b, Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane., J. Gen. Physiol. 68, 519-535.

Yoshida, M., Izumi, K., Koja, T., Fukuda, T., Munekata, E. y Nakanishi, T., 1986, Inhibitory effect of taurine on wet-dog shakes produced by [D-ALA, MET] enkephalinamide with reference to effects on hippocampal epileptic discharges., Neuropharmacology. 25 (12), 1373-1378.