

03062

S
2ej-

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

EPILEPSIA LIMBICA PRODUCIDA POR LA ADMINISTRACION DE ROJO DE
RUTENIO EN EL AREA CA₁ DEL HIPOCAMPD

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA:

GUILLERMINA SILVIA GARCIA UGALDE

Ciudad Universitaria, México, D. F. 1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ABREVIATURAS

APH	ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico
APV	ácido 2-amino-5-fosfonovalérico
CPP	ácido fosfónico-3-(2-carboxipiperacina-4-il-propil-1)
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3,-diona
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAD	glutamato descarboxilasa
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HT ₂	Receptor serotoninérgico tipo 2
i.h.	intrahipocampal
i.p.	intraperitoneal
KS	ketanserina
MK-801	5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo a,d ciclo \pm hepteno-5,10 imina
NA	ácido nípecótico
NMDA	N-metil-D-aspártico
PCA	p-clorofenilalanina
PCP	fenilciclídina
RRu	Rojos de Rutenio
THIP	4,5,6,7, tetrahidroisoxazolo [5,4-c] piridin-3-ol

RESUMEN

La epilepsia límbica se manifiesta cuando se afecta la función de estructuras cerebrales como el hipocampo (TINS 11(2): 63, 1988). Por otro lado, el Rojo de Rutenio (RRu) es un compuesto inorgánico que se ha empleado para estudiar las posibles alteraciones que provocan epilepsia a nivel experimental (Brain Res. 154: 163, 1978). En el presente trabajo se caracterizó que el RRu desencadena epilepsia límbica, una vez que se administra en el hipocampo de la rata. Este compuesto se inyectó con ayuda de un aparato estereotáxico en el área CA₁ del hipocampo (1.5 nmolas en 0.1 µl), y posteriormente se analizaron los trastorno conductuales que manifiestan los animales inyectados. Se encontró que las ratas presentan los signos característicos de la epilepsia límbica, y en asociación la conducta de "sacudida de perro mojado" que es una manifestación de carácter no-convulsivo. Con base en la observación microscópica del hipocampo inyectado con el RRu, se encontró que este compuesto se concentra en los somas de las neuronas piramidales de esta estructura. Por este hecho se propuso que el RRu produce actividad epileptiforme al afectar el funcionamiento de tales neuronas excitadoras. Finalmente, a través de la administración sistémica y/o intrahipocampal de fármacos que afectan a la neurotransmisión que se encuentra mediada por la serotonina, el ácido glutámico o el ácido γ -aminobutírico (GABA), se evaluó la participación de estos neurotransmisores en la generación de las alteraciones

que produce el RRU. En este estudio se identificó que los antagonistas serotoninérgicos y glutamatérgicos bloquean la conducta de SPM cuando se administran por vía sistémica.

INDICE

	Pags.
INTRODUCCION	
Aspectos generales de la epilepsia	1
Farmacología de la transmisión GABAérgica	4
La transmisión sináptica GABAérgica en el hipocampo	7
Farmacología de la transmisión glutamatérgica	12
La transmisión sináptica glutamatérgica en el hipocampo	14
Participación de los receptores tipo NMDA en la generación de estados de hiperexcitabilidad hipocampal	18
Participación del hipocampo en el desarrollo de epilepsia parcial	19
ANTECEDENTES	22
OBJETIVOS	26
RESULTADOS	27
Convulsions and wet-dog shakes produced by systemic or intrahippocampal administration of ruthenium red in the rat (Exp Brain Res (1991) 86:633-640)	28

Metodología de los experimentos que no se incluyen en el artículo

Procedimiento por el que se administraron los antagonistas del receptor tipo NMDA a las ratas tratadas con el RRu 36

Procedimiento por el que se procesó el área CA₁ del hipocampo para observar al RRu a través de microscopía electrónica 37

Procedimiento para observar a través de microscopía óptica, los efectos que produce el RRu a largo plazo 38

Procedimiento para la inyección del RRu sobre la corteza cerebral de la rata 38

Resultados de los experimentos que no se incluyen en el artículo

Efecto de los antagonistas del receptor tipo NMDA sobre la conducta de SPM que produce el RRu 40

Localización del RRu (por medio de microscopía electrónica) en las neuronas hipocampales 41

Descripción de los efectos que produce el RRu a largo plazo en el hipocampo 43

Localización del RRu en la corteza cerebral a través de microscopía óptica y electrónica 43

DISCUSION GENERAL

Efectos conductuales que produce el RRu 51

Efectos que produce el RRu sobre la
citoarquitectura del hipocampo 57

REFERENCIAS 61

INTRODUCCION

Aspectos generales de la Epilepsia

La epilepsia es una patología que se presenta cuando se altera el funcionamiento de las neuronas excitadoras e inhibitoras del sistema nervioso central (Dichter y Ayala, 1987).

Durante esta patología las neuronas de algunas áreas del cerebro se mantienen hiperexcitadas a través de dos mecanismos principales. Por un lado, esta condición anormal se puede producir cuando hay una disminución o pérdida de la eficacia de los sistemas inhibitorios GABAérgicos (Dichter y Ayala, 1987; Roberts, 1986), o una vez que se sobreactivan los circuitos neuronales excitatorios que en su mayoría son glutamatérgicos (Dichter y Ayala, 1987).

El primer concepto mencionado anteriorente se demostró al observar que la epilepsia se puede desencadenar, al impedir la síntesis del ácido γ -aminobutírico (GABA) con drogas como el ácido 3-mercaptopropiónico, la tiosemicarbazida o la metoxipiridoxina (Tapia, 1975), o al bloquear su liberación con la toxina tetánica (Fisher, 1989; Louis et al., 1987). También se produce actividad epileptiforme cuando se afecta el funcionamiento de los receptores postsinápticos de este neurotransmisor, con la penicilina, la bicuculina o la picrotoxina (Ben-Ari et al., 1981; Fisher, 1989; Tapia, 1975).

De igual manera, la pérdida de la efectividad de la neurotransmisión GABAérgica favorece el establecimiento de la epilepsia crónica a nivel experimental. Ribak et al. (1979) demostró que hay una pérdida selectiva de las neuronas

inhibitorias que contienen a la enzima de síntesis del GABA (glutamato descarboxilasa; GAD), en la porción de la corteza cerebral en donde se produjo epilepsia focal con la crema de alúmina, probablemente por la presencia de actividad epiléptica sostenida.

Posteriormente se demostró que la actividad de la GAD y el número de receptores GABAérgicos cambia, en los focos epilépticos corticales que se generan por la aplicación tópica de cobalto (Bailey y Harris, 1981; Ross y Craig, 1981). Dicha disfunción de la transmisión GABAérgica también se ha descrito en los diferentes modelos de epilepsia determinada genéticamente (Laird et al., 1984).

Un segundo grupo de estudios confirmaron que la sobreactivación de los circuitos neuronales excitatorios también produce hiperexcitabilidad cerebral (Stone y Burton, 1988). El L-glutamato y L-aspartato son los transmisores que generan tal anormalidad.

Inicialmente, Hayashi (1954) demostró que la aplicación del ácido L-glutámico en la superficie de la corteza cerebral provoca convulsiones. Asimismo, Johnston (1972) describió que los aminoácidos excitadores, como el ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), producen epilepsia en los ratones. Tales evidencias sugirieron que los transmisores antes mencionados pueden provocar que las neuronas descarguen de un modo anormal.

Sin embargo, el papel que juega la transmisión excitadora en la generación de crisis epilépticas se pudo evaluar con mayor detalle, hasta que se dispuso de los antagonistas específicos

de los receptores sensibles a tales neurotransmisores (Fagg et al., 1986; Stone y Burton, 1988).

En dichas investigaciones se pudo comprobar que los receptores que reconocen al NMDA, se activan durante el desarrollo de varios tipos de epilepsia que se producen experimentalmente (Stone y Burton, 1988). Este receptor participa en la producción de crisis epilépticas debido a que su canal acoplado se activa de una manera dependiente del voltaje (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984).

Durante la epilepsia se puede facilitar la activación del receptor tipo NMDA, ya que predomina la despolarización neuronal dentro de la región afectada. Por consiguiente, este evento puede acentuar el desbalance entre excitación e inhibición que prevalece en el sistema nervioso (Wheal, 1989).

Además, los fármacos con propiedades antagonistas sobre este receptor suprimen la epilepsia que producen, los diferentes agentes que bloquean la transmisión sináptica GABAérgica, o los estímulos externos (luz, sonido) en los animales genéticamente propensos a esta patología (Stone y Burton, 1988).

Croucher y colaboradores (1982) fueron los primeros en encontrar que el ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico (APH) y otros antagonistas fosfonados que actúan sobre el receptor del NMDA, previenen las convulsiones generadas por la administración del pentilinetetrazol, las provocadas por sonido en los ratones DBA/2 y las producidas fóticamente en el mandril (Meldrum et al., 1983). Asimismo, tanto el ácido 2-amino-5-fosfonovalérico (APV) como el APH son capaces de inhibir las convulsiones que se

observan al administrar los antagonistas del receptor GABA_A, la picrotoxina o la bicuculina, así como los inhibidores de la síntesis del GABA, el ácido 3-mercaptopropiónico o la tiosemicarbazida (Czuczwar y Meldrum, 1982; Piredda y Gale, 1986).

Tomando en cuenta que los disturbios de la transmisión GABAérgica o de la mediada por los aminoácidos excitadores pueden producir epilepsia, a continuación se describirán algunos aspectos farmacológicos de estos dos tipos de transmisiones sinápticas, y se hará énfasis en denotar el papel que juegan éstas en la epilepsia que se genera en el hipocampo a través de diferentes mecanismos.

Farmacología de la transmisión GABAérgica

El GABA es el neurotransmisor inhibitor mas ampliamente distribuido en el cerebro (Turner y Whittle, 1983). Este neurotransmisor hiperpolariza a las neuronas debido a que genera una corriente entrante de iones cloro cuando interactúa con algunos de sus receptores (Bormann, 1988). Tal efecto fisiológico se puede reproducir con drogas como el muscimol o el THIP (4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo [5,4-c] piridin-3-ol), y bloquear con la bicuculina o la picrotoxina (Turner y Whittle, 1983).

Con base en estudios de unión con ligandos radioactivos se propuso que los agonistas GABAérgicos antes mencionados (muscimol y THIP), la bicuculina y el propio GABA, comparten el mismo sitio de acción dentro del complejo proteico que conforma al receptor de este aminoácido (Olsen, 1987).

Este hecho se determinó al considerar que estos fármacos pueden desplazar a dicho neurotransmisor de sus sitios de unión específicos que se localizan en las membranas sinápticas. Por esta razón, la bicuculina se considera un antagonista competitivo del receptor del GABA (Olsen, 1987; Turner y Whittle, 1983).

Los receptores del GABA que son sensibles a la bicuculina se conocen como receptores GABA_A (Bormann, 1988). El receptor GABA_A está conformado por el sitio al que se une el GABA, su canal asociado y por otros componentes proteicos acoplados que son capaces de modular tanto la afinidad que tiene el ligando por el receptor, como la disponibilidad del sitio al que se une el neurotransmisor inhibitor (Bormann, 1988; Turner y Whittle, 1983) (Fig. 1). Estos componentes adicionales corresponden a los sitios de unión de las benzodiazepinas y los barbitúricos.

Un segundo tipo de receptor GABAérgico, el denominado GABA_B, se activa selectivamente por su ligando específico, el baclofen (β-p-clorofenil-GABA). Este receptor difiere en varios aspectos del receptor GABA_A "clásico" (Bormann, 1988).

En el sistema nervioso se han reconocido dos subtipos de este receptor GABAérgico (Bormann, 1988). Uno de ellos afecta una corriente entrante de calcio que es dependiente de voltaje en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Bormann, 1988), y en las terminales de las células bipolares de la retina (Maguire et al., 1989). Este receptor se localiza a nivel presináptico en la médula espinal (Kerr et al., 1987) y en la retina (Maguire et al., 1989), y además, modula la liberación de neurotransmisores

Sinapsis GABAérgica

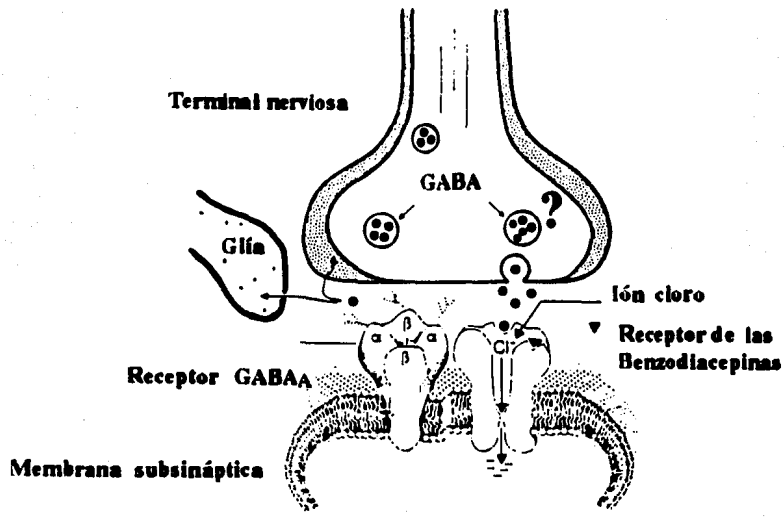


Fig. 1. Representación de la sinapsis GABAérgica en donde se muestra la estructura aproximada del receptor GABA_A (Esquema modificado de Richards et al., 1988).

6

que es dependiente de calcio (Bormann, 1989).

El segundo subtipo de este receptor activa una corriente saliente de potasio en las neuronas piramidales del área CA₁ del hipocampo (Soltesz et al., 1988). Dicho evento dependiente de potasio da origen a los potenciales postsinápticos inhibitorios tardíos que son bloqueados por el antagonista del receptor GABA_B, el faclofen (Soltesz et al., 1988), y que persisten en presencia de la bicuculina (Newberry y Nicoll, 1984). Estos receptores GABA_B se localizan postsinápticamente en el hipocampo y la neocorteza (Karlsson et al., 1988; Soltesz et al., 1988), y se encargan de hiperpolarizar a las células nerviosas (Soltesz et al., 1988).

Ambos tipos de receptores GABAérgicos se encuentran acoplados a sus canales respectivos a través de proteínas G sensibles a la toxina pertusis (Bormann, 1988).

La transmisión sináptica GABAérgica en el hipocampo

En el hipocampo se han descrito varios tipos de interneuronas inhibitorias que se encuentran distribuidas diferencialmente, y que poseen características morfológicas específicas (Andersen, 1987).

Por una parte, las células en canasta se localizan en el borde del estrato radiado y el oriens de la región CA₁ del hipocampo. Estas interneuronas interactúan con el soma de las neuronas piramidales a través de una sinapsis de tipo axosomática (Fig. 2), y además reciben a las colaterales axonales de dichas neuronas piramidales (inhibición recurrente) (Andersen, 1987).

Un segundo tipo de interneuronas, es un grupo de células con

axones cortos que se les ha denominado colectivamente células estrelladas, y que se localizan en el estrato lacunoso-molecular del hipocampo. Este tipo de neuronas establece el contacto sináptico sobre las dendritas apicales de las células piramidales excitadoras (Andersen, 1987) (Fig. 2). Finalmente, se ha descrito que un tercer tipo de neuronas, las células en candelabro, se localizan dentro del estrato piramidal en la región CA₁ (Andersen, 1987). Los axones de dichas células terminan alrededor del segmento inicial del axón de las neuronas piramidales (Andersen, 1987) (Fig 2).

A través de la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas se ha demostrado que muchas de estas neuronas contienen a la GAD (Walaas, 1983). Además, tal parece que la excitabilidad de las neuronas piramidales del hipocampo, está controlada por el efecto inhibitorio tónico que ejercen dichas interneuronas GABAérgicas (Roberts, 1986).

Por medio de acercamientos electrofisiológicos se ha caracterizado que el efecto hiperpolarizante que ejercen las interneuronas GABAérgicas sobre las neuronas piramidales está conformado por dos componentes: (a) un evento temprano que se produce por la activación de los receptores GABA_A y en consecuencia es dependiente de cloro, y (b) un componente lento que se desencadena por la activación de receptores GABA_B y que es dependiente de potasio (Newberry y Nicoll, 1984). El componente tardío desaparece cuando se aplica el antagonista del receptor GABA_B, el faclofen (Soltesz et al., 1988), y es insensible a la acción de la bicuculina (Newberry y Nicoll, 1984)

Entradas excitadoras

Entradas inhibitorias

Célula estrellada

Célula en canasta

Célula en candelero

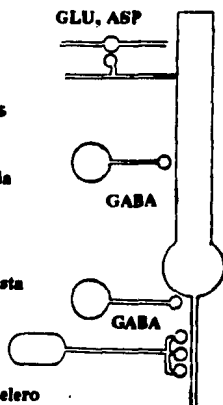


Fig. 2 Diagrama que muestra los diferentes tipos de interneuronas GABAérgicas y la región de la neurona piramidal sobre la que establecen el contacto sináptico. La célula en canasta interactúa con el soma de la neurona piramidal, mientras que la célula en candelabro establece el contacto sináptico sobre el segmento inicial del axón. La interneurona estrellada actúa sobre las dendritas de las mismas neuronas excitadoras (Andersen, 1987).

(Fig. 3).

El componente temprano, que no es más que el potencial postsináptico inhibitor (PPSI) temprano, tiene gran importancia en el hipocampo ya que es el responsable de producir la inhibición de tipo recurrente que controla la actividad de las células piramidales (Wheal, 1989). Los PPSI tempranos se generan cuando se activan las células en canasta que innervan el soma de las neuronas piramidales, así como, por acción de las interneuronas en candelabro que interactúan con el segmento inicial del axón de las mismas células piramidales (Wheal, 1989). Por otro lado, los PPSI tardíos se registran a nivel dendrítico una vez que se activan las sinapsis que se establecen entre las células estrelladas y la porción dendrítica de las células piramidales (Andersen, 1987; Wheal, 1989) (Fig. 3).

En otros estudios se pudo confirmar que la inhibición GABAérgica regula la actividad intrínseca de las neuronas excitadoras del hipocampo (Kemp et al., 1986; Rovira et al., 1984). En dichos trabajos se demostró que los agonistas del receptor GABA_A, el muscimol o el THIP, suprimen completamente la actividad excitadora de las células piramidales del área CA₁ que se produce al estimular las fibras comisurales-colaterales de Schaffer (Kemp et al., 1986).

Además, Ault y Nadler (1983) describieron que el agonista selectivo del receptor GABA_B, el baclofen, produce también una inhibición completa de la actividad excitadora que se genera en el área CA₁; tal efecto es insensible a la aplicación de la bicuculina o la picrotoxina. Sin embargo, el efecto que producen

GABA · g
A Cl⁻

GABA · g
B K⁺

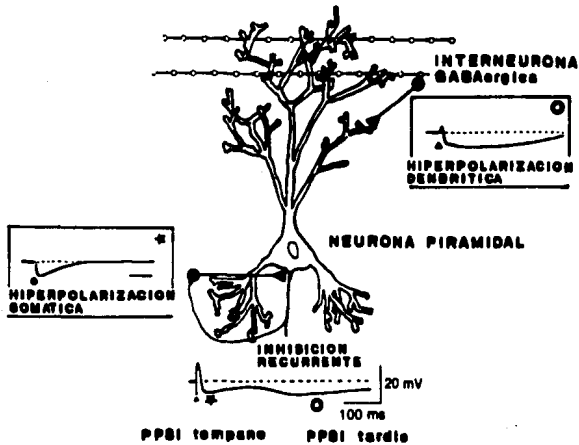


Fig. 3 Esquema en el que se muestran los PPSI que se registran en las neuronas piramidales del hipocampo. En el recuadro de la izquierda se muestra el PPSI "temprano" que se produce cuando se activan los receptores GABA_A somáticos. En la derecha se presenta el PPSI "tardío" que se observa cuando se activan los receptores GABA_B dendríticos. En la parte inferior de la figura se presenta el registro intracelular de una neurona piramidal, en el que se señalan los 2 tipos de PPSI que produce el GABA y que se indican en los recuadros. Abreviaturas: g_{Cl^-} = conductancia de Cl⁻ y g_{K^+} = conductancia de K⁺. (Figura modificada de Avoli, 1988).

los agonistas del receptor GABA_A (párrafo anterior) se bloquean cuando se administran los antagonistas antes mencionados (Kemp et al., 1986).

Es importante mencionar que gracias a los estudios hechos en rebanadas del hipocampo, se sugirió que el baclofen posee propiedades anticonvulsivantes. Dicho antagonista es capaz de bloquear las descargas epileptiformes de las células piramidales de la región CA₃ que se desencadenan por la aplicación de bicuculina, ácido kaínico o altas concentraciones de potasio (Ault et al., 1986; Swartzwelder et al., 1986). De igual manera, el baclofen deprime la actividad epiléptica que produce el ácido kaínico in vivo, y en consecuencia reduce la degeneración neuronal en el hipocampo (Ault et al., 1986a).

Farmacología de la transmisión glutamatérgica

Los ácidos glutámico y aspártico son los transmisores excitadores más abundantes en el sistema nervioso central (SNC) (Cotman et al., 1987). El efecto fisiológico que ejercen dichos aminoácidos se produce cuando se activan diferentes receptores que se localizan en las membranas neuronales (Mayer y Westbrook, 1987). Se han caracterizado preferentemente tres subtipos de receptores que reconocen a estos transmisores excitadores. Dichos receptores se denominaron de acuerdo al agonista selectivo que los activa. Uno de ellos reconoce al NMDA que es un análogo estructural del ácido aspártico (Stone y Burton, 1988). El segundo se activa por el ácido kaínico, y el tercero por el ácido quisquálico, que son análogos del ácido glutámico (Mayer y Westbrook, 1987).

El receptor del NMDA está asociado a un canal que es permeable a los iones Ca^{2+} y Na^+ (Mayer y Westbrook, 1987). Este receptor y su canal acoplado conforman un complejo proteico que posee varios sitios adicionales que regulan su actividad (Reynolds y Miller, 1988). Por ejemplo, el canal de este receptor se bloquea con el magnesio a través de un mecanismo que es dependiente del voltaje (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984) (Fig. 4).

Johnson y Ascher (1987) demostraron que la glicina facilita el efecto excitador que ejerce el NMDA. De este modo, la glicina se comporta como neurotransmisor inhibitor cuando activa al receptor que incrementa la permeabilidad de los iones Cl^- en la médula espinal, y además potencia la excitación que produce el NMDA. Este último efecto que produce la glicina no se antagoniza con la estricnina que es el bloqueador del receptor inhibitor "clásico" (Thomson, 1989). Dicho aminoácido incrementa la frecuencia de apertura del canal que está acoplado al receptor del NMDA, debido a que facilita la interacción del agonista con su sitio de unión (Thomson, 1989). Por consiguiente, se ha propuesto que hay un acoplamiento directo entre el receptor del NMDA, su canal acoplado y un receptor de la glicina que es insensible a la estricnina (Fig. 4).

Por otro lado, la fenilciclidina (PCP) y la ketamina se comportan como antagonistas no competitivos, debido a que se unen a un segundo sitio de regulación que se encuentra dentro del canal de este receptor (Lodge y Johnson, 1990) (fig.4). Sin

embargo, los anestésicos antes mencionados así como el MK-801, pueden antagonizar al receptor únicamente cuando el canal se encuentra abierto (Huettner y Bean, 1988).

Un sitio adicional que es ocupado por el zinc (Zn^{2+}) también bloquea al receptor del NMDA (Peters et al., 1987; Westbrook y Mayer, 1987). El Zn^{2+} actúa en un sitio diferente al del Mg^{2+} que se localiza en la parte extracelular de la membrana neuronal.

Los receptores que son sensibles al ácido quisquálico se han subdividido en dos tipos. Uno de ellos está acoplado a canales de Na^+ , y el segundo subtipo se encuentra asociado a un sistema de segundos mensajeros que mobilizan al Ca^{2+} de pozas intracelulares (Murphy y Miller, 1988). El efecto despolarizante que produce el ácido quisquálico puede ser potenciado por el Zn^{2+} (Peters et al., 1987), y bloqueado por el 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3,-diona (CNQX).

El ácido kaínico despolariza a las neuronas a través de la activación de un canal que incrementa el influjo de Na^+ . Este receptor es bloqueado por el CNQX al igual que el del ácido quisquálico (Mayer y Westbrook, 1987).

La transmisión sináptica glutamatérgica en el hipocampo

En el hipocampo, la transmisión excitadora ocurre por medio de la activación de una vía trisináptica (Andersen, 1987; Lambert et al., 1989). El primer relevo sináptico se establece entre las terminales de las fibras que provienen de la corteza entorrinal, y las células granulares del giro dentado del hipocampo a través de la vía perforante. Subsecuentemente, las células granulares se comunican con las neuronas piramidales del área CA_3 por medio de

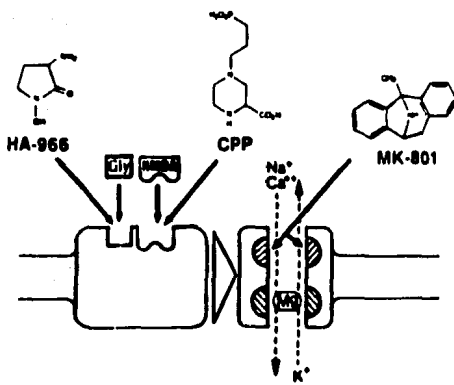


Fig. 4 Representación del receptor que reconoce al NMDA. En el esquema se muestran los diferentes sitios que regulan la actividad de este receptor y que se mencionan en el texto. La acción del NMDA puede ser bloqueada farmacológicamente de tres maneras: con antagonistas como el CPP que compiten con el NMDA por el mismo sitio de unión, al bloquear el sitio de la glicina con el HA-966 y con antagonistas no-competitivos como el MK-801 (McDonald y Johnston, 1990).

las fibras musgosas. Finalmente, las neuronas piramidales del sector CA₃ envían sus fibras axonales, conocidas como fibras colaterales de Schaffer, hacia la región CA₁ en donde establecen el contacto sináptico con las neuronas piramidales de esta área (Andersen, 1987; Lambert et al., 1989) (Fig. 5).

La excitación que resulta de la activación de esta vía trisináptica está mediada por diversos receptores que son sensibles a los ácidos L-glutámico y L-aspartico (Lambert et al., 1989).

Dentro de este grupo de receptores, aquéllos que se activan por el ácido kaínico así como los sensibles al ácido quisquálico, son los presuntos responsables de generar a los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) rápidos en el hipocampo (Herron y Forsythe, 1989; Lambert et al., 1989). Esta idea se fundamenta en el hecho de que el bloqueador de los receptores del tipo "no NMDA", el CNQX, es capaz de reducir marcadamente el componente rápido en las tres sinapsis (Lambert et al., 1989).

Por otro lado, los receptores que activa el NMDA están involucrados en la producción de los PPSE lentos (Herron y Forsythe, 1989; Lambert et al., 1989), ya que el APV es capaz de reducirlos o incluso abolirlos (Herron y Forsythe, 1989; Lambert et al., 1989). Además, tal PPSE se facilita marcadamente tanto en amplitud como en duración, cuando las rebanadas del hipocampo se mantienen en medios libres de magnesio (Herron y Forsythe, 1989; Lambert et al., 1989). Aparentemente estos potenciales excitatorios ocurren en los tres relevos sinápticos del hipocampo (Lambert et al., 1989).

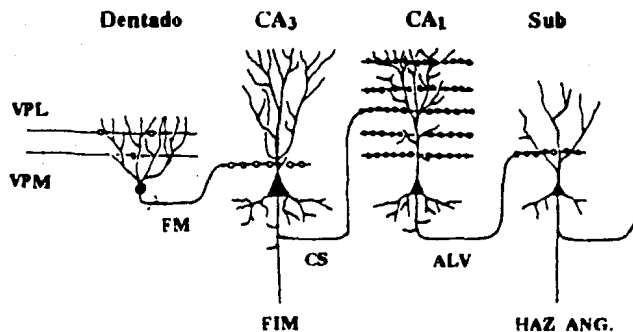
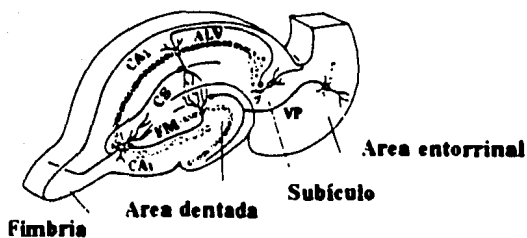


Fig. 5. Representación de las conexiones excitatorias que se establecen entre las neuronas piramidales de las diferentes regiones del hipocampo. En la parte inferior se muestra la secuencia de activación de dichas neuronas piramidales, y se señalan las 2 vías eferentes principales que proyectan del área CA₃ y del subículo. Abreviaciones: ALVEUS (ALV); HAZ ANG. (HAZ ANGULAR); FIMBRIA (FIM); VIA PERFORANTE LATERAL (VPL); FIBRAS MUSGOSAS (FM); VIA PERFORANTE MEDIAL (VPM); VIA PERFORANTE (VP); COLATERAL DE SCHAFFER (CS); Subículo (Sub). Andersen, 1987.

Participación de los receptores tipo NMDA en la generación de estados de hiperexcitabilidad hipocampal

Sobre la base de estudios autoradiográficos se ha descrito que el hipocampo tiene la mayor densidad de receptores tipo NMDA (Cotman et al., 1987). Además, en otros trabajos se puntualizó que la porción dendrítica de las neuronas piramidales del área CA₁ del hipocampo es particularmente rica en estos receptores (Lambert et al., 1989). A pesar de esta gran abundancia, dicho receptor no participa directamente en el establecimiento de la transmisión sináptica excitadora rápida hipocampal (Herron y Forsythe, 1989).

Por el contrario, se ha propuesto que el receptor del NMDA puede amplificar el grado de excitación del hipocampo (Lambert et al., 1989). Para retomar esta idea, es importante considerar que el efecto despolarizante que ejerce el NMDA está regulado por el magnesio de una manera dependiente del potencial de membrana (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Este efecto que ejerce el magnesio decrece cuando la membrana neuronal se encuentra despolarizada (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Por consiguiente, el receptor tipo NMDA se ve liberado del bloqueo que ejerce dicho catión divalente cuando se genera un estado de despolarización sostenida, por lo que, puede contribuir a la permanencia de tal estado de despolarización (Herron y Forsythe, 1989).

Esta observación tiene implicaciones importantes en ciertas condiciones anormales, tales como durante la epilepsia. En esta patología se incrementa la liberación de transmisores

excitadores, y en consecuencia las neuronas se encuentran preferentemente despolarizadas. Por esta razón, se facilita la activación de los canales acoplados al receptor del NMDA (Herron y Forsythe, 1989).

Además, se puede registrar un componente despolarizante que se encuentra mediado por el receptor sensible al NMDA, cuando la inhibición sináptica del hipocampo se afecta con drogas convulsivantes como la bicuculina (Dingledine et al., 1990). De este modo, la excitación que producen los receptores tipo NMDA, puede amplificar la hiperexcitabilidad que desencadenan los antagonistas del GABA en el hipocampo (Dingledine et al., 1990; Herron y Forsythe, 1989). Por tales hallazgos se ha sugerido que la transmisión GABAérgica puede modular la participación de este receptor durante la epilepsia.

Finalmente se ha llegado a demostrar que los PPSE se pueden prolongar por la activación de este receptor, hasta que las neuronas tienen una actividad de tipo epileptiforme en presencia de agentes convulsivantes. Al parecer, la actividad epileptiforme de las neuronas del hipocampo se puede considerar como una respuesta que se encuentra influenciada por la activación del receptor tipo NMDA, ya que los antagonistas selectivos de este receptor se comportan como antiepilepticos en tales instancias (Dingledine et al., 1990).

Participación del hipocampo en el desarrollo de epilepsia parcial

La epilepsia se ha clasificado en dos tipos principales de acuerdo a su sitio de origen. Se habla de una epilepsia generalizada cuando la actividad paroxística ocurre

bilateralmente y de un modo sincrónico en ambos hemisferios cerebrales. Por el contrario, cuando las descargas epileptiformes ocurren en una parte circunscrita del cerebro se le reconoce como una epilepsia parcial o de origen focal (Gloor y Fariello, 1988).

Dentro de las epilepsias parciales se encuentran aquellas que se originan en alguna estructura límbica. Desde el punto de vista experimental, una vez que se estimula eléctricamente la amígdala o el hipocampo se observan los signos conductuales característicos de la epilepsia límbica en la rata (Girgis, 1981). De igual manera, la inyección intrahipocampal de varios convulsivantes, como el ácido kainico, produce este tipo de manifestaciones epilépticas (Ben-Ari et al., 1981).

Se ha caracterizado que en la rata la actividad epileptiforme de origen límbico se acompaña de una manifestación conductual de carácter no convulsivo que es la conducta de "sacudida de perro mojado" (SPM).

La conducta de SPM puede ocurrir como respuesta a una gran variedad de manipulaciones farmacológicas, tales como la inyección de los péptidos opioides endógenos (Lee et al., 1989), el ácido kainico (Isaacson y Lanthorn, 1981), el 5-hidroxitriptofano (Bedard y Pycocock, 1977) y por la interrupción de la administración de la morfina (Wei, 1973).

Asimismo, la estimulación eléctrica de áreas límbicas como el hipocampo (Lerner-Natoli et al., 1984), la amígdala (Squillace et al., 1980), la corteza entorrinal (Frush y McNamara, 1986) o el septum (Le Gal La Salle y Cavalheiro, 1981), son otras estrategias experimentales que producen actividad epileptiforme

en asociación con SPM.

En algunos trabajos se ha descrito que la activación de las neuronas del hipocampo es importante para observar esta conducta (Frush y McNamara, 1986; Grimes et al., 1988). De este modo, la lesión de las neuronas del área CA₃ o de las células granulares del giro dentado del hipocampo, suprime la aparición de SPM que se asocian con la epilepsia (Frush y McNamara, 1986; Grimes et al., 1988). En dichos estudios se sugiere que al activarse las células del hipocampo, se activan de un modo secundario algunas estructuras extralímbicas que residen en áreas motoras y que finalmente son las responsables de generar esta conducta.

En la literatura existe controversia sobre el tipo de transmisión nerviosa que regula la expresión de esta conducta (Handley y Singh, 1986). Sin embargo, se ha indicado que las SPM se presentan una vez que se activan las neuronas serotoninérgicas del SNC (Handley y Singh, 1986; Tricklebank, 1985). Dicha aseveración se sustenta en los estudios que describen que la conducta de sacudida, se produce por la administración de algunos agonistas serotoninérgicos o con el precursor de este neurotransmisor, el 5-hidroxitriptofano (Bedard y Pycoc, 1977). Además, ciertos trabajos indican que esta conducta se observa cuando se activa el receptor tipo 2 de este neurotransmisor (Handley y Singh, 1986; Yap y Taylor, 1983). Asimismo, es importante mencionar que aunque existen varios agentes que producen SPM, como se indicó anteriormente, en la mayoría de los casos éstas se suprimen con los antagonistas específicos de los receptores serotoninérgicos (Handley y Singh, 1986).

ANTECEDENTES

Es evidente que existen una gran cantidad de agentes que son capaces de producir epilepsia experimental a través de diferentes mecanismos. En esta sección se describirán las acciones que ejerce el rojo de rutenio sobre los diferentes procesos fisiológicos en los que se ha valorado su efecto, y que justificaron su aplicación como convulsivante en este trabajo de tesis.

El colorante inorgánico rojo de rutenio (RRu) es un agente capaz de bloquear la unión o el transporte de calcio en diferentes preparaciones biológicas. Inicialmente se describió que el RRu inhibe la captura de calcio mitocondrial (Moore, 1971; Vasington et al., 1972; Reed y Bygrave, 1974; Luthra y Olson, 1977).

De igual manera, dicho compuesto bloquea la unión del Ca^{2+} al sarcolema aislado (Madeira y Antunes-Madeira, 1974); ya que esta inhibición no depende de la concentración de RRu en el medio de incubación, se propuso que el colorante no compite con el Ca^{2+} por el mismo sitio de unión. Estos hallazgos coinciden con los que fueron observados por Reed y Bygrave (1974) quienes trabajaron con membranas mitocondriales.

Además, el RRu inhibe selectivamente a la enzima que es responsable del transporte activo del calcio, la ATPasa del calcio, que se encuentra presente en mitocondrias (Vasington et al., 1972), en el sarcolema (Madeira y Anunes-Madeira, 1974) y en las membranas de eritocitos aisladas (Watson et al., 1974).

Por otro lado, se ha reconocido ampliamente que la entrada

de calcio a las terminales nerviosas presinápticas, es un evento que se requiere para desencadenar la liberación de neurotransmisores. Tomando en cuenta esta idea, se valoró el efecto que ejerce el RRU sobre la unión y el transporte de calcio en terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas). En estos estudios se reportó que el RRU inhibe de un modo no-competitivo, la unión del calcio a los sinaptosomas aislados de la corteza cerebral de la rata (Kamino et al., 1976). Aunque el sitio de unión específico de este colorante no se ha descrito con precisión, se ha propuesto que el RRU se combina fuertemente con las glicoproteínas de la membrana sinaptosomal que probablemente están conformando al sitio de unión del calcio (Kamino et al., 1976). Este sitio de interacción del RRU se sugirió con base en los trabajos que describen que este compuesto se une a las glicoproteínas de las membranas celulares (Luft, 1971), y por el hecho de que inhibe la unión del calcio a las glicoproteínas aisladas de membranas mitocondriales (Sottocasa et al., 1972).

Asimismo, el RRU se une a las terminales nerviosas aisladas e impide la entrada de calcio estimulada por despolarización, sin afectar el influjo basal de este catión (Tapia et al., 1985). Por tal razón, se sugirió que el RRU es capaz de bloquear a los canales de calcio dependientes de voltaje que se encuentran presentes en los sinaptosomas (Tapia et al., 1985).

El efecto que ejerce el RRU sobre las membranas sinápticas sirvió para sustentar la idea de que este compuesto podría tener la capacidad de bloquear la transmisión sináptica química, al impedir la liberación de transmisores tanto a nivel central como periféricamente.

Rahamimoff y Alnaes (1973) demostraron que el RRu inhibe la liberación estimulada de transmisores en la unión neuromuscular, y sugieren que este efecto se debe a la combinación firme del colorante con los sitios del calcio que se ubican en la membrana presináptica. Por otro lado, Person y Kuhn, (1979) confirmaron el efecto bloqueador que ejerce el RRu sobre la liberación de acetilcolina en la sinapsis neuromuscular.

El efecto inhibitor que ejerce el RRu sobre la liberación de neurotransmisores que es dependiente de calcio, también se observó al utilizar terminales nerviosas aisladas del cerebro (Tapia y Meza-Ruíz, 1977).

Además de los experimentos realizados en preparaciones aisladas que sugieren que el RRu es un catión capaz de interrumpir la secreción de sustancias neuroactivas, se desarrollaron algunos estudios *in vivo* que confirmaron dicho efecto. En estos trabajos se observó que el RRu tiene efectos diferenciales que dependen de la vía de administración que se utilice. Cuando el RRu se administra por vía intraperitoneal produce un estado de parálisis flácida en ratones y gatos (Tapia et al., 1976), en tanto que si se inyecta directamente en el cerebro se comporta como un agente excitador y desencadena convulsiones tónico-clónicas generalizadas (Tapia et al., 1976).

Aparentemente, ambos efectos se generaron por el disturbio de algún mecanismo dependiente de calcio, ya que tanto el efecto paralizante como las convulsiones generalizadas se previnieron por la inyección de cloruro de calcio (Tapia et al., 1976). Además, un agente quelante del Ca^{2+} , el EDTA, ejerce efectos

parecidos a los que produce el RRU (Tapia, et al., 1976).

En otros estudios se comprobó que la parálisis flácida es el resultado del efecto que ejerce el RRU a nivel presináptico (Tapia, 1982). En dicho trabajo se administraron compuestos que facilitan la liberación de neurotransmisores en la unión neuromuscular, tales como la 4-aminopiridina o la guanidina (Lundh, 1978; Lundh y Thesleff, 1977), a los ratones en estado de parálisis flácida. A través de esta estrategia experimental se pudo antagonizar el efecto paralizante que ejerce el RRU. Por consiguiente, la parálisis producida por este agente se atribuyó a una probable inhibición de la liberación de acetilcolina dependiente de calcio.

Tomando en cuenta que el GABA es uno de los neurotransmisores inhibidores que participa en el control de la excitabilidad neuronal, se propuso que las convulsiones producidas por el RRU podían ser el resultado de la deficiencia en la liberación dependiente de calcio de este transmisor. Esta hipótesis se confirmó al observar dicha disminución de la liberación del GABA, en los sinaptosomas aislados del cerebro de los ratones con convulsiones generalizadas (Tapia y Meza-Ruiz, 1978).

Finalmente, es necesario hacer notar que cuando el RRU se administra por vía intraperitoneal, en la rata ejerce un efecto bifásico que difiere de lo observado en ratones y gatos (Tapia et al., 1976). Arauz-Contreras y colaboradores (1982) demostraron que la administración sistémica del RRU es capaz de producir tanto parálisis flácida generalizada, como convulsiones tónico-clónicas en la rata.

OBJETIVOS

En el presente trabajo se empleó al RRU como herramienta experimental debido a su capacidad de producir hiperexcitabilidad cerebral.

Se propuso caracterizar el efecto que produce el RRU en el hipocampo, por medio del estudio de los signos conductuales propios de la epilepsia límbica en la rata. Así como, correlacionar tales alteraciones con los efectos que ejerce el RRU sobre la citoarquitectura del hipocampo.

A través de una aproximación farmacológica, se trató de valorar si la alteración de la transmisión mediada por el GABA, la serotonina y/o los aminoácidos excitadores, es la responsable de desencadenar la epilepsia límbica que produce el colorante.

RESULTADOS

Convulsions and wet-dog shakes produced by systemic or intrahippocampal administration of ruthenium red in the rat

G. García-Ugalde and R. Tapia

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70–600, 04510–México, D.F., México

Received March 7, 1991 / Accepted May 8, 1991

Summary. In this work we have studied in the rat the behavioral effects of the intraperitoneal (i.p.) and intrahippocampal (i.h.) administration of ruthenium red (RuR), an inorganic dye which has been shown to inhibit neurotransmitter release in synaptosomes. The i.p. injection induced initially flaccid paralysis and subsequently generalized tonic-clonic convulsions. In contrast, unilateral RuR microinjection into the CA₁ area of the hippocampus produced complex seizure behavior and wet-dog shakes (WDS). The i.p. administration of the serotonin receptor antagonist ketanserin markedly inhibited the WDS induced by i.h. RuR. In contrast, the i.h. injection of ketanserin and of the γ -aminobutyric acid (GABA) agonists 4,5,6,7-tetrahydroisoxazol[5,4-c]pyridin-3-ol (THIP) and baclofen together with RuR did not affect the frequency of WDS nor the seizure behavior. However, the i.h. injection of the GABA uptake blocker nipecoic acid, simultaneously with RuR, increased the frequency of WDS. The release of [³H]GABA, measured in synaptosomes of different cerebral structures of the rats injected i.p. with RuR, and in slices of the CA₁ area after i.h. injection of the dye, was not affected. Histological observations of the injected area showed a specific and intense staining of the somas of the CA₁ pyramidal neurons. It is concluded that the convulsant action induced by i.h. RuR microinjection is probably the result of an increased excitability of these CA₁ neurons, which is independent of any action on GABA release.

Key words: Hippocampus – Epilepsy – Ruthenium red – GABA – Serotonin

Introduction

It has been previously shown that the inorganic dye ruthenium red (RuR) exerts inhibitory effects on the

binding and transport of Ca²⁺ in synaptic membranes (Kamino et al. 1976; Tapia et al. 1985a, b; Arias and Tapia 1986), and blocks the Ca²⁺-dependent transmitter release in synaptosomes (Tapia and Meza-Ruiz 1977; Tapia 1985) and in the neuromuscular junction (Person and Kuhn 1979). This drug has also interesting actions in vivo on motor behavior. When this dye is administered intraperitoneally to mice and cats it produces flaccid paralysis, whereas its intracerebroventricular or intracisternal injection induces tonic-clonic convulsions (Tapia et al. 1976; Tapia 1985). Since the paralyzing effect of RuR is completely antagonized by drugs which stimulate neurotransmitter release, such as 4-aminopyridine, this action of RuR has been interpreted as due to its inhibitory effect on the Ca²⁺-dependent release of acetylcholine at neuromuscular synapses (Tapia 1982). On the other hand, its central effect, which was initially postulated as due to an inhibition of γ -aminobutyric acid (GABA) release in the central nervous system (Meza-Ruiz and Tapia 1978), has been recently found to involve other neuronal mechanisms different from its action on neurotransmitter release (Tapia and Flores-Hernández 1990).

In the hippocampus, a region particularly susceptible to seizures, the GABA-mediated inhibitory circuits play an essential role in the control of excitability (Schwartzkroin and Knowles 1983; Roberts 1986). The GABA_A agonists muscimol and 4,5,6,7-tetrahydroisoxazol[5,4-c]pyridin-3-ol (THIP), as well as some GABA uptake blockers, inhibit the somatic population spike elicited by commissural stimulation in the pyramidal layer of the CA₁ region in vivo (Rovira et al. 1984). The GABA_B agonist baclofen, which produces hyperpolarization of single neurons in CA₁ (Newberry and Nicoll 1985) also markedly inhibits the epileptiform activity in vitro (Ault and Nadler 1982, 1983; Ogata et al. 1986).

Additionally, an involvement of the hippocampus in the onset of limbic seizures has been well characterized (Gale 1988). Among the behavioral patterns observed during the development of limbic seizures induced by kainic acid and by kindling of limbic structures, a pecu-

ESTA TESTE NO REDE
 SAMBA NO LA BARRA

liar motor abnormality, known as "wet-dog shakes" (WDS) was described as an ictal and postictal event (Squillace et al. 1980; Le Gal La Salle and Cavalheiro 1981; Rondouin et al. 1987). This finding suggests that there may be an association between electrical seizure activity and WDS. The latter behavior has been characterized as intermittent simultaneous shaking of the head, neck and trunk, and seems to be related to the activation of serotonergic circuits (Bedard and Pycock 1977).

In view of the above, in the present work we have studied comparatively the behavioral effects of the intraperitoneal (i.p.) and the intrahippocampal (i.h.) administration of RuR in rats. Using histological, neurochemical and pharmacological approaches, attempts were made to obtain information on the mechanisms of the observed effects.

Methods

Adult male Wistar rats (190–210 g weight) were used in all experiments. RuR, *p*-chloroamphetamine (PCA) and Direct blue 15 were obtained from Sigma; THIP hydrochloride, (\pm)baclofen and (\pm)nipecotic acid from Research Biochemicals; ketanserin tartrate from Janssen; and [3 H]GABA (sp. act. 36 Ci/mmol) from NEN Dupont.

Systemic administration of RuR

Groups of rats were injected i.p. with 2.2, 4.4, 6.6 and 8.8 mg/kg of RuR in aqueous solution and their motor behavior was observed. Some animals injected with 4.4 mg/kg were killed by decapitation at 4 or 6 h, or at the time they showed tonic-clonic convulsions. Brains were immediately removed and the regions mentioned below were dissected bilaterally on ice by the procedure described by Hoffner et al. (1980) for obtaining the synaptosomal fractions employed to measure GABA release.

Synaptosomal fraction

A purified synaptosomal fraction was isolated from the hippocampus, mesencephalon, striatum and frontal cortex of rats injected i.p. with RuR, by the procedure described by Löscher et al. (1985). We have previously confirmed by electron microscopy the purity of these synaptosomal fractions (Diaz-Muñoz and Tapia 1988). In all experiments brains from control and RuR-treated animals were handled in parallel during the preparation of the synaptosomal fractions and their superfusion to study GABA release.

Intrahippocampal injection of RuR

Rats were anesthetized with halothane in oxygen and injected unilaterally into the hippocampal region CA₁. Stereotaxic coordinates, according to the atlas of Paxinos and Watson (1986) were 3.3 AP, 1.5 L and 3.9 V, with reference of bregma. The aqueous solution of RuR (1.5 nmol in 0.1 μ l) was injected in 3–5 min, using a 0.5 μ l or 1 μ l Hamilton syringe held in a manual Kopf injector mounted on the stereotaxic frame.

The motor behavior of the animals was recorded during 4.5–5 h after the injection. At the end of the observation period, rats were sacrificed and their brains were removed and frozen to verify the injection site after sectioning the tissue (40 μ m slices) in a cryostat. Control animals were injected with a solution of Direct blue 15 (6 mg/ml, 0.1 μ l) in the same area of the hippocampus. No altera-

tion in the behavior of these animals was observed, thus indicating that effects of RuR might be due to the damage produced by the needle or by the vehicle.

In some experiments the brains of the rats injected with RuR or Direct blue 15 were frozen and sectioned in a cryostat as above, but the sections were dehydrated with graded ethanol and xylol, covered with coverslips and observed at various magnifications without further staining, in order to locate more precisely the cellular binding sites of both dyes.

In order to study the GABA release from the injected hippocampus, the RuR-stained CA₁ area was dissected on ice by the procedure described by Chavkin et al. (1985) and sliced perpendicularly to the longitudinal axis of the hippocampus (200 μ m thickness), using a McIlwain tissue chopper. Since the RuR staining spread along the antero-posterior axis of the injection site but did not diffuse ventrally into the inner layers of the hippocampus (see Results), the release of GABA was measured from 10–12 pooled CA₁ slices of approximately 2 mm diameter. In these experiments the region CA₁ of the non-injected side was handled in parallel and served as control.

[3 H]GABA release

The release of labeled GABA from synaptosomes and hippocampal slices was studied by superfusion technique previously described (Tapia and Sities 1982). Briefly, CA₁ slices and synaptosomal fraction were resuspended in a small volume (1 ml and 0.5 ml respectively) of oxygenated Krebs-Ringer medium containing (in mM): 118 NaCl, 1.2 NaH₂PO₄, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 5.6 glucose, 25 Tris-HCl, pH 7.4 and 0.1 aminoxyacetic acid. The slices and synaptosomes were preincubated for 10 min at 37°C in the volume of oxygenated Krebs-Ringer medium mentioned above. At the end of this preincubation period, [3 H]GABA (0.45 μ Ci, 1.25 μ M) was added and the incubation continued for 10 min for the uptake of the compound. The total volume of incubation medium was then transferred to parallel chambers, washed and superfused. Fractions were collected every min and after 5 min of spontaneous release the superfusion medium was quickly substituted by a medium containing a depolarizing KCl concentration (47 mM) (NaCl concentration was proportionally reduced to maintain osmolarity). In the experiments with hippocampal tissue, CA₁ slices from the RuR-injected side and those from the contralateral side were handled in parallel during the superfusion. The radioactivity released in each fraction was counted by scintillation spectrometry after the addition of 5 ml of Tritolol (Fricke 1975). The results are expressed as percent of total radioactivity released per minute (total radioactivity = total released plus that remaining in the tissue at the end of the superfusion).

GABA and serotonin (5-HT) drugs

To determine the effect of agents that enhance GABAergic transmission on the RuR-induced motor alterations, the GABA_A agonist THIP (2 and 5 nmol) and the GABA_B agonist baclofen (4 nmol), as well as the GABA uptake blocker nipecotic acid (2 nmol), were injected in the CA₁ area of the hippocampus simultaneously with RuR. Drugs were delivered into the CA₁ in a volume of 0.1 μ l, except baclofen, that was injected in 0.2 μ l. RuR (1.5 nmol) was dissolved in the same aqueous solution of GABAergic drugs. In some rats the GABAergic drugs were microinjected in a solution of Direct blue 15 (6 mg/ml) into the same area of the hippocampus, in order to evaluate the possible behavioral alterations produced by these drugs in the absence of RuR.

For studying 5-HT participation in the effects of RuR, the selective 5-HT₂ receptor antagonist ketanserin (Leysen et al. 1982) was used. This antagonist was administered i.p. at a dose of 2 mg/kg immediately after the i.h. injection of RuR. The corresponding control group received a proportional volume of distilled water. A

group of animals was injected into the CA₁ area with Direct blue 15 (6 mg/ml, 0.1 μ l) and immediately after with i.p. ketanserin, in order to evaluate the behavioral effects produced by this antagonist per se.

In another group of rats, ketanserin (4 nmol in 0.1 μ l) was injected into the hippocampus together with RuR (1.5 nmol). Control animals received only ketanserin dissolved in Direct blue 15 to identify the injection site.

In other experiments, rats were treated with two i.p. injections (24 h apart) of p-chloroamphetamine (PCA; 6 mg/kg), which causes a marked depletion of 5-HT in brain (Sanders-Bush and Massari 1977) and 24 h after the second injection they were injected i.h. with RuR (1.5 nmol in 0.1 μ l).

Results

Effects of i.p. administration of RuR

Rats injected i.p. with 2.2 mg/kg showed only frequent head shakes and grooming in the first 6 hours after injection ($n = 7$). In contrast, 6.6 and 8.8 mg/kg produced loss of motor coordination and intense diaphragmatic contractions, generalized shakes, loss of righting reflex and death in 5–25 min ($n = 6$).

Interestingly, rats treated with RuR at the intermediate dose of 4.4 mg/kg ($n = 17$) showed two clearly distinguished effects. The initial one appeared at 31.3 ± 2.5 min and was characterized by difficulty in limb movements and subsequent complete flaccid paralysis. This stage lasted for about 3 h (198 ± 17 min) and then the animals slowly recuperated the muscular tone. The second effect of RuR at this dose was the appearance of generalized tonic-clonic convulsions and immediate death, which occurred at about 6 h (368 ± 15 min) after treatment in 8 of the 17 rats treated. The remaining 9 rats showed tremor but no convulsions up to 9 h observation. However, since all of them were found dead the following day, presumably they also had convulsions just before death.

[³H]GABA release from synaptosomes

An inhibition of synaptosomal GABA release has been observed after the intracisternal injection of RuR in mice and it has been related to the appearance of seizures (Meza-Ruiz and Tapia 1978). It was therefore of interest to see whether GABA release was affected at the time of the central effects produced in rats by the i.p. injection of RuR (4.4 mg/kg). The release of [³H]GABA from synaptosomes isolated from hippocampus, mesencephalon, striatum and frontal cortex was measured at 4 h ($n = 8$), 6 h ($n = 6$) and at the time of generalized tonic-clonic convulsion ($n = 6$). No difference was found in the spontaneous nor in the depolarization-induced release of this amino acid, in any of the regions studied, as compared to control animals (data not shown). The release curves obtained were similar to those previously reported in synaptosomes from these brain regions (Diaz-Muñoz and Tapia 1988).

Effects of i.h. administration of RuR

The injection of RuR into the hippocampal CA₁ region produced various motor signs which resemble those described as limbic type seizures in rats (Ben-Ari et al. 1981; Gale 1988). Immediately after recovering from anaesthesia, animals showed frequent grooming and at about 30 min after injection they started showing WDS, which were similar to those observed after the systemic ad-

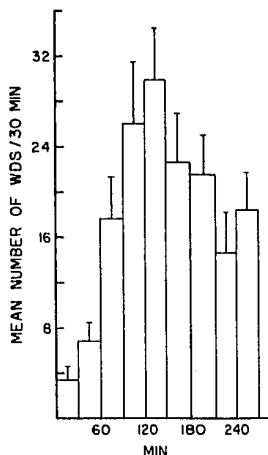


Fig. 1. Wet dog shakes induced by the microinjection of RuR (1.5 nmol in 0.1 μ l) into the hippocampal CA₁ area. Each bar represents the mean value of the number of WDS in 30 min periods \pm SEM for 14 rats. Zero time is the time of recovery from anaesthesia (about 10 min after the microinjection)

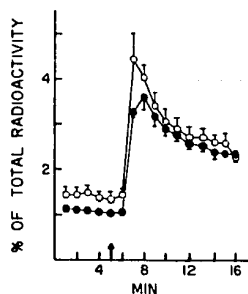


Fig. 2. Release of [³H]GABA from slices of the CA₁ region microinjected with RuR (closed symbols) and from the contralateral CA₁ area (open symbols), 2.5 h after injection. Tissue was loaded with labeled GABA and superfused as described under Materials and Methods. The arrow indicates the substitution of the normal superfusion medium by a medium containing a depolarizing KCl concentration (47 mM). Each value is the mean \pm SEM for 8 rats (SEM values for the first points of the treated rats were smaller than the size of the symbol)

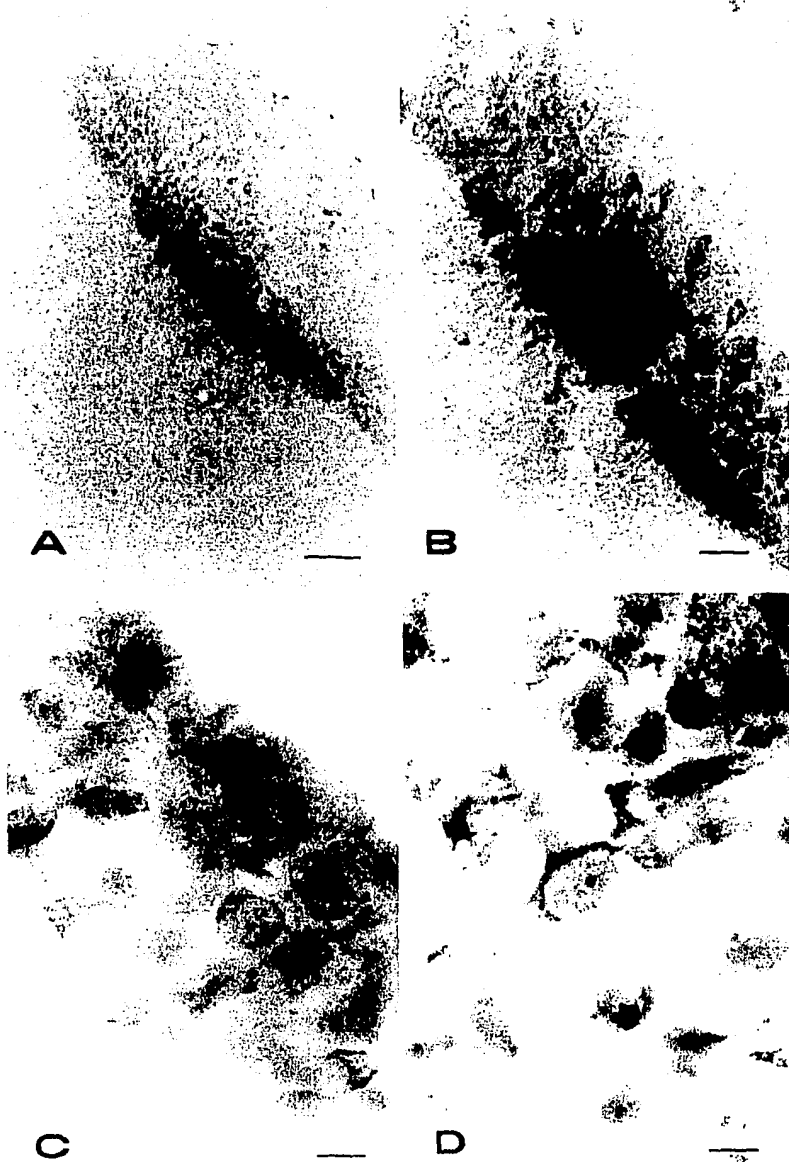


Fig. 3A-D. Localization of RuR after its microinjection into in the CA₁ region of the hippocampus. Note that the dye did not diffuse concentrically but distributed closely following the cell layers, and that staining was restricted to the somas of pyramidal neurons. At higher magnification (C, D) it can be observed that RuR tended to

concentrate in the periphery of cell bodies and in the nucleolus. This specific staining was similar at 30 min (D) and at 1 h (A-C) after the microinjection of RuR. Bars indicate 70 μ m (A), 25 μ m (B) and 10 μ m (C, D).

ministration of kainic acid (Ben-Ari et al. 1981). As shown in Fig. 1, the number of WDS in 30 min periods increased progressively in the first 90 min and reached a maximal value of 26-30/30 min from 90 to 150 min after treatment. After this time the number of WDS decreased until extinguished at about 24 hours.

Besides WDS, several signs characteristic of the seizure activity seen after repeated electrical stimulation of the hippocampus or another limbic structures (Racine 1972), or after systemic injection of kainic acid (Ben-Ari et al. 1981) were observed. They included sniffing, masticatory movements and head nodding, rearing with forelimb clonus and rearing followed by loss of postural control. These signs were more clearly noted when the WDS began to subside, at about 2.5 h after treatment.

[³H]GABA release from hippocampal slices

Because of the reasons stated above, it was also of interest to see whether the release of GABA was affected after the microinjection of RuR into the CA₁ area. When studied at 2.5 h after injection of the dye (at the peak of WDS frequency) there was no difference in the K⁺-stimulated release of [³H]GABA in the CA₁ slices obtained from treated animals, as compared either with the contralateral non-injected hippocampus (Fig. 2) or with the tissue injected with Direct blue (not shown). In other experiments, the release of [³H]GABA was measured at one hour after RuR microinjection and it was not significantly affected (*n* = 7, data not shown).

Localization of RuR in the hippocampus

The motor signs produced by the i.h. injection of RuR were always associated with the location of this dye into the CA₁ area. The distribution of the dye in this region, in dehydrated tissue sections, is shown in Fig. 3. A highly selective RuR staining was observed, since it was restricted to the somas of pyramidal neurons arranged in a dense continuous layer, the stratum pyramidale. A less intense staining was observed in the apical dendrites of the same neurons contained in the stratum radiatum. At higher magnifications (Fig. 3C and D) it can be seen that the dye penetrated into the neuronal bodies and tended to concentrate mainly at the edges of the cell body and in the nucleolus. This characteristic staining pattern was observed almost immediately after RuR injection, since the hippocampus of animals sacrificed 10 min after treatment also showed this dye specific distribution (not shown). Electron microscopic observation of the CA₁ area injected confirmed the presence of RuR inside the cell nucleus and showed that starting at about 30 min after the injection the neuronal somas were progressively damaged, as evidenced by vacuolization of the cytoplasm, whereas the neuropil looked normal (Garcia-Ugalde and Tapia, in preparation).

Effect of GABAergic drugs on the RuR-induced WDS

The simultaneous i.h. injection of nipecotic acid significantly increased the number of WDS produced by RuR,

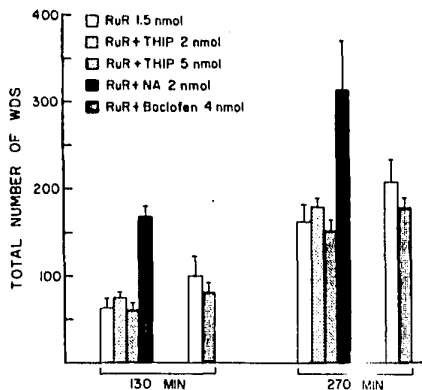


Fig. 4. Effect of GABAergic drugs on the wet dog shakes induced by RuR. THIP (2 nmol, *n* = 7; 5 nmol, *n* = 10), nipecotic acid (NA, *n* = 7), and baclofen (*n* = 4) were injected simultaneously with RuR into the hippocampal CA₁ region. The volume of the solution injected was 0.1 μ l for THIP and NA, and 0.2 μ l for baclofen (due to its lower solubility). Because of this, two control values of rats injected only with RuR are shown (*n* = 14 for 0.1 μ l and *n* = 4 for 0.2 μ l). Mean values \pm SEM of the total number of WDS observed in 130 and 270 min after the injection. The differences between RuR alone and RuR + NA were significant: *p* < 0.001 and *p* < 0.01 for 130 and 270 min, respectively (Student's *t* test)

as compared to controls (Fig. 4). This potentiation by nipecotic acid was more notable during the initial 130 min after injection (165% increase), and it was still clear when the total number of WDS was recorded during 270 min (93% increase). The i.h. administration of THIP and of baclofen, at doses equal or higher than the effective dose of nipecotic acid, had no effect on the frequency of RuR-induced WDS in the same observation periods (Fig. 4). There was no apparent effect of nipecotic acid or the GABA agonists on the other signs of stereotyped behavior produced by RuR. None of the animals injected with GABAergic drugs alone showed any behavioral alteration (*n* = 3-5).

Effect of 5-HT drugs on the RuR-induced WDS

The i.h. injection of ketanserin, simultaneously with RuR, did not affect the number of WDS in the first 70 min after treatment. The mean number of WDS in this period for the group injected with both drugs was 21.6 ± 8.7 (*n* = 6) and in the controls 16.8 ± 4.2 (*n* = 14). Four rats were injected with 4 nmol of ketanserin alone and they did not show any behavioral alteration. In contrast to these results, the i.p. administration of ketanserin immediately after i.h. RuR resulted in an almost complete inhibition of the shaking behavior over the first 70 min postanesthesia (Fig. 5). WDS appeared at about 80 min, probably because the action of ketanserin began to subside, but the number of WDS recorded during all

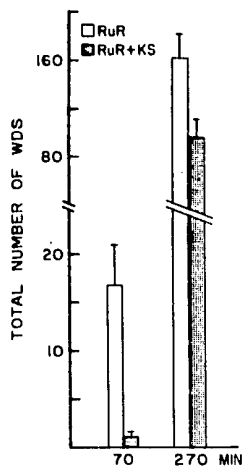


Fig. 5. Effect of the 5-HT₂ antagonist ketanserin (KS; 2 mg/kg, i.p.) on the wet dog shakes induced by RuR i.h. (1.5 nmol). KS was administered about 10 min after RuR. Mean values \pm SEM of the total number of WDS observed in 70 and 270 min after recovery from anesthesia (RuR, $n=14$; RuR \pm KS, $n=9$). The differences between the two groups were significant: $p < 0.01$ and $p < 0.05$ for 70 and 270 min, respectively

the observation period was also decreased (Fig. 5). The RuR-induced seizure behavior was not affected by ketanserin, since during the effect of this drug the rats showed grooming, marked masticatory movements, vibrissae twitching, head nodding and occasionally rearing with forelimb clonus. Rats injected with Direct blue into the hippocampus and immediately after with ketanserin i.p. showed only a slight sedation.

The group of rats injected i.p. twice with PCA, at the dose indicated under Methods, showed locomotor hyperactivity, marked salivation and WDS. The latter appeared about 10 min postinjection and lasted for about 2 h. Rats did not present PCA-produced WDS 24 h later, at the time of the i.h. injection of RuR. In 5 of the 12 rats pretreated with PCA, the total number of WDS induced by RuR i.h. was clearly reduced (during 270 min these rats showed 48.2 ± 12.3 WDS, vs 161 ± 20.3 in the controls; $n=14$, $p < 0.01$). However, in the remaining 7 animals this behavior was not affected (177 ± 23.2 WDS), probably because in these rats 5-HT concentration was less depleted.

Discussion

The results of this study demonstrate a differential effect of RuR in rats depending on route of administration. When administered systemically it produced initially generalized flaccid paralysis and subsequently tonic-clonic convulsions. In contrast, the injection of RuR into the CA₁ area of the hippocampus induced complex seizure behavior and WDS. The central effects of the systemic administration of RuR seem to be restricted to the rat, since we have previously found that its i.p. injection in mice and cats produced only flaccid paralysis. Since in the latter two species intense convulsive activity was observed a few minutes after the intracisternal or intracerebroventricular injection of low doses of the dye (Tapia et al. 1976; Tapia 1985), and this occurs also in

the rat (Garcia-Ugalde and Tapia, unpublished), the delayed convulsant effect of i.p. RuR in the rat might be due to a slow penetration of the dye into the brain. However, the possibility that convulsions occur as a consequence of a different cerebral process, secondary to the paralysis phase, cannot be discarded.

Whereas the cerebral cortex seems to participate mainly in generalized paroxysmal activity, seizure behavior as that observed after the i.h. RuR injection corresponds to the description of limbic type seizures, in which the hippocampal formation plays a central role. This type of behavior is generally accompanied or followed by WDS, which therefore may be considered as an index of paroxysmal activity in the hippocampus. In fact, the occurrence of WDS associated with limbic discharges appears to be related to the activation of hippocampal neurons, since electrolytic lesions of the hippocampus markedly reduce the WDS behavior induced by kainic acid or enkephalins (Isaacson and Lanthorn 1981).

WDS behavior seems to be the result of the activation of central 5-HT mechanisms, to such an extent that it has been considered a quantitative behavioral model of serotonergic hyperactivity (Bedard and Pycock 1977). Thus, 5-hydroxytryptophan administration induces WDS that are markedly reduced in rats with lesions of hippocampal CA₁ region (Isaacson and Lanthorn 1981) and are also antagonized by the systemic administration of selective 5-HT₂ antagonists like ketanserin and pirenperone (Yap and Taylor 1983). Since i.p. ketanserin completely antagonized the WDS induced by i.h. RuR, and the serotonin depleting drug PCA also markedly blocked them in 5 of 12 rats, it may be safely concluded that serotonergic transmission plays an important role in the expression or modulation of the WDS produced by RuR through the excitation of pyramidal CA₁ neurons. The finding that only the i.p. administration of ketanserin, but not its i.h. microinjection, resulted in this antagonist action, suggests that the inhibition by ketanserin of serotonergic transmission is not primarily in the CA₁ region of the hippocampus, although obviously RuR is acting at this structure (in fact, the density of 5-HT₂ receptors in the hippocampus is low; Leysen et al. 1983). The site of action of ketanserin might be the motor cortex, since in the rat 5-HT₂ binding sites are highly concentrated in this structure (Leysen et al. 1982, 1983; Pazos et al. 1985). Although serotonergic transmission in other structures would be also blocked after i.p. ketanserin, a cortical involvement in the induction of WDS is supported by the observation of a relationship between the number of 5-HT₂ receptors in this structure and the frequency of WDS (Koshikawa et al. 1985a, b). This interpretation implies an interaction between hippocampus and neocortex, and in fact it has been reported that some ventral CA₁ cells project to the 5-HT₂-rich prefrontal cortex, besides indirect projections through the subiculum and entorhinal cortex (Bayer 1985).

In an attempt to determine the possible involvement of GABA-mediated inhibitory circuits in the excitation of hippocampal neurons by RuR, we tested the action of some GABAergic drugs on the behavioral effects of RuR. While no action of the GABA_A agonist THIP or the GABA_B agonist baclofen was found, a

paradoxical increase in the frequency of RuR-induced WDS was observed when the GABA uptake inhibitor nipeptic acid was injected simultaneously with RuR into the CA₁ area, at doses smaller than those of the GABA agonists. Although we cannot offer a clearcut explanation for this potentiation, two possibilities may be considered. The first is a direct effect of GABA on serotonergic nerve endings, since the existence of GABA heteroreceptors on hippocampal terminals, related to the release of 5-HT, has been demonstrated (Balfour 1980). However, this is improbable since the GABA agonists did not affect the number of WDS. The second possibility is that nipeptic acid is acting as a "false transmitter" in the hippocampus. This is supported by previously reported experiments *in vitro* and *in vivo*. Thus, in brain slices nipeptic acid, as well as *cis*-3-aminocyclohexane carboxylic acid (ACHC) and 2,4-diaminobutyric acid (DABA), are rapidly taken up by neurons and may displace GABA from storage sites and be released during physiological activity (Johnston et al. 1976; Neal and Bowery 1977; Weitsch-Dick et al. 1978). This false neurotransmitter effect has been observed also *in vivo* (Lerma et al. 1985), and has been postulated to explain the decrement of the inhibitory postsynaptic potentials produced by nipeptic acid in hippocampal slices (Korn and Dingleline 1986), as well as the epileptiform motor manifestations observed in the absence of auditory stimulus in DBA/2 mice after administration of DABA and ACHC (Horton et al. 1979).

The results of the release experiments show that RuR did not significantly affect [³H]GABA release in synaptosomes after its *i.p.* administration nor in hippocampal slices after its *i.h.* microinjection. These findings agree with the lack of effect of the *i.h.* injection of GABA agonists on RuR-induced motor alterations. Furthermore, our histological observations clearly showed a specific location of RuR inside neuronal somas and a progressive damage of the RuR-containing cells. Therefore, we conclude that the effects of RuR after *i.h.* microinjection are due mainly to an intracellular effect of the dye, which results in an increased excitability of the pyramidal neurons of the CA₁ region. Although the mechanism of this excitotoxic action of RuR is not known, it is of interest that this dye seems to be concentrated in neurons after its intraparenchymal microinjection, independently of the injected region, since we have found a similar intraneuronal location after the microinjection of the dye into the substantia nigra, where it produces behavioral effects that can also be ascribed to an excitatory action on such neurons (Tapia and Flores-Hernández 1990).

Acknowledgements. This work was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (project P228CCOX-880370) and from the Programa de Apoyo a los Proyectos de Investigación (DGAPA, UNAM, project 1N.02.10.89).

References

- Arias C, Tapia R (1986) Differential calcium-dependence of γ -aminobutyric acid and acetylcholine release in mouse brain synaptosomes. *J Neurochem* 47:396-404
- Ault B, Nadler JV (1982) Baclofen selectively inhibits transmission at synapses made by axons of CA₁ pyramidal cells in the hippocampal slice. *J Pharmacol Exp Ther* 223:291-297
- Ault B, Nadler JV (1983) Anticonvulsant-like actions of baclofen in the rat hippocampal slice. *Br J Pharmacol* 78:701-708
- Balfour DJK (1980) Effects of GABA and diazepam on ³H-serotonin release from hippocampal synaptosomes. *Eur J Pharmacol* 68:11-16
- Bayer SA (1985) Hippocampal region. In: Paxinos G (ed) *The rat nervous system*, Vol 1. Academic Press, Sidney, pp 335-352
- Bedard P, Pycock CJ (1977) "Wet-dog" shake behaviour in the rat: a possible quantitative model of central 5-hydroxytryptamine activity. *Neuropharmacology* 16:663-670
- Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R (1981) Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentylenetetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 6:1361-1391
- Chavkin CH, Shoemaker WJ, McGinty JF, Bayon A, Bloom FE (1985) Characterization of the prodynorphin and proenkephalin neuropeptide systems in rat hippocampus. *J Neurosci* 5:808-816
- Diaz-Muñoz M, Tapia R (1988) Regional brain GABA metabolism and release during hepatic coma produced in rats chronically treated with carbon tetrachloride. *Neurochem Res* 13:37-44
- Fricke U (1975) Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton-X-100. *Anal Biochem* 63:555-558
- Gale K (1988) Progression and generalization of seizure discharge: anatomical and neurochemical substrates. *Epilepsia* 29 (Suppl 2):S15-S34
- Heffner GT, Hartman AJ, Seiden SL (1980) A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 13:453-456
- Horton RW, Collins JF, Anlezark GM, Meldrum BS (1979) Convulsant and anticonvulsant actions in DBA/2 mice of compounds blocking the reuptake of GABA. *Eur J Pharmacol* 59:75-83
- Isaacson RL, Lanthorn TH (1981) Hippocampal involvement in the pharmacologic induction of withdrawal-like behaviors. *Fed Proc* 40:1508-1512
- Johnston GAR, Stephenson AL, Twitchin B (1976) Uptake and release of nipeptic acid by rat brain slices. *J Neurochem* 26:83-87
- Kamino K, Ogawa M, Uyesaka N, Inouye A (1976) Calcium-binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. IV. Effects of ruthenium red on the co-operative nature of calcium binding. *J Membr Biol* 26:345-356
- Korn SJ, Dingleline R (1986) Inhibition of GABA uptake in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 368:247-255
- Koshikawa F, Koshikawa N, Stephenson JD (1985a) Effects of antidepressant drug combinations on cortical 5-HT₂ receptors and wet-dog shakes in rats. *Eur J Pharmacol* 118:273-281
- Koshikawa N, Smokuc RWJ, Stephenson JD (1985b) Is waning of a 5-hydroxytryptamine (5-HT)-mediated syndrome due to 5-HT₂ receptor down-regulation? *Neurosci Lett* 55:279-282
- Le Gal La Salle G, Cavalheiro EA (1981) Stimulation of septal and amygdaloid nuclei: EEG and behavioral responses during early development of kindling with special reference to wet dog shakes. *Exp Neurol* 74:717-727
- Lerma J, Herrerias O, Martin del Rio R (1985) Electrophysiological evidence that nipeptic acid can be used *in vivo* as a false transmitter. *Brain Res* 335:377-380
- Leyens JE, Niemegeers CJE, Van Nueten JM, Laduron PM (1982) [³H]Ketanserin (R 41 468), a selective ³H-ligand for serotonin₂ receptor binding sites. Binding properties, brain distribution, and functional role. *Mol Pharmacol* 21:301-314
- Leyens JE, Van Gompel P, Verwimp M, Niemegeers CJE (1983) Role and localization of serotonin₂ (S₂)-receptor-binding sites: effects of neuronal lesions. In: Mandel P, DeFuidis FV (eds) *From molecular pharmacology to behavior*. Raven Press, New York, pp 373-383
- Löscher W, Böhme G, Müller F, Pagliusi S (1985) Improved meth-

- od for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal γ -aminobutyric acid in vivo. *J Neurochem* 45:879-889
- Meza-Ruiz G, Tapia R (1978) [3 H]GABA release in synaptosomal fractions after intracranial administration of ruthenium red. *Brain Res* 154:163-166
- Neal MJ, Bowery NG (1977) Cis-3-aminocyclohexanecarboxylic acid: a substrate for the neuronal GABA transport system. *Brain Res* 138:169-174
- Newberry N, Nicoll R (1985) Comparison of the action of baclofen with γ -aminobutyric acid on rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J Physiol (London)* 360:161-185
- Ogata N, Matsuo T, Inoue M (1986) Potent depressant action of baclofen on hippocampal epileptiform activity in vitro: possible use in the treatment of epilepsy. *Brain Res* 377:362-367
- Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney
- Pazos A, Cortés R, Palacios JM (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* 346:231-249
- Person RJ, Kuhn JA (1979) Depression of spontaneous and ionophore-induced transmitter release by ruthenium red at the neuromuscular junction. *Brain Res Bull* 4:669-674
- Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281-294
- Roberts E (1986) Failure of GABAergic inhibition: a key to local and global seizures. *Adv Neurol* 44:319-341
- Rondouin G, Lerner-Natoli M, Hashizume A (1987) Wet dog shakes in limbic versus generalized seizures. *Exp Neurol* 95:500-505
- Rovira C, Ben-Ari Y, Cherubini E (1984) Somatic and dendritic actions of γ -aminobutyric acid agonists and uptake blockers in the hippocampus in vivo. *Neuroscience* 12:543-555
- Sanders-Bush E, Massari VJ (1977) Actions of drugs that deplete serotonin. *Fed Proc* 36:2149-2153
- Schwartzkroin PA, Knowles WD (1983) Local interactions in the hippocampus. *Trends Neurosci* 6:88-92
- Squillace KM, Post RM, Pert A (1980) Development of wet dog shakes during amygdala kindling in the rat. *Exp Neurol* 70:487-497
- Tapia R (1982) Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in mice by 4-aminopyridine, guanidine and lanthanum. *Neurosci Lett* 30:73-77
- Tapia R (1985) Effects of drugs on neurotransmitter release: experiments in vivo and in vitro. *Neurosci Biobehav Rev* 9:391-397
- Tapia R, Flores-Hernández J (1990) Circling behavior induced by intranigral administration of ruthenium red and 4-aminopyridine in the rat. *Neuroscience* 39:657-663
- Tapia R, Meza-Ruiz G (1977) Inhibition by ruthenium red of the calcium-dependent release of [3 H]GABA in synaptosomal fractions. *Brain Res* 126:160-166
- Tapia R, Sitges M (1982) Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res* 250:291-299
- Tapia R, Meza-Ruiz G, Durán L, Drucker-Colin RR (1976) Convulsions or flaccid paralysis induced by ruthenium red depending on route of administration. *Brain Res* 116:101-109
- Tapia R, Arias C, Morales E (1985a) Binding of lanthanum ions and ruthenium red to synaptosomes and its effects on neurotransmitter release. *J Neurochem* 45:1464-1470
- Tapia R, Sitges M, Morales E (1985b) Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res* 361:373-382
- Yap CY, Taylor DA (1983) Involvement of 5-HT $_2$ receptors in the wet-dog shake behaviour induced by 5-hydroxytryptophan in the rat. *Neuropharmacology* 22:801-804
- Weitsch-Dick F, Jessell TM, Kelly JS (1978) The selective neuronal uptake and release of [3 H]DL-2,4-diaminobutyric acid by rat cerebral cortex. *J Neurochem* 30:799-806

Metodología de los experimentos que no se incluyen en el artículo

Procedimiento por el que se administraron los antagonistas del receptor tipo NMDA a las ratas tratadas con el RRu.

En estos experimentos se usaron ratas Wistar de 190-200g de peso y el RRu se inyectó en el sector CA₁ del hipocampo tal como se describe en el manuscrito.

Para determinar si la transmisión excitadora interviene de algún modo en la expresión de la conducta de SPM que produce el RRu, se administraron diferentes antagonistas del receptor que reconoce al NMDA.

Los antagonistas competitivos de este receptor, el ácido (±) 2-amino-7-fosfonoheptánico (APH) y el (±)-3-(2-carboxipiperacina-4-il)-propil-1-ácido fosfónico (CPP), se disolvieron por separado en la solución que contenía al RRu (1.5 nmolas en 0.1 µl). Posteriormente, ambos antagonistas se administraron simultáneamente con el RRu en el hipocampo. El antagonista de tipo no competitivo, el (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo a,d ciclo ± hepteno-5,10 imina (MK-801), también se administró junto con el RRu en el área CA₁.

Estos compuestos se probaron en una concentración de 2.5 nmolas. Una vez inyectados en el hipocampo se cuantificó la conducta de sacudida que produce el RRu. En todos los casos, la solución que contenía a los antagonistas antes mencionados, se ajustó a un pH de aproximadamente 7 con NaOH (2 N).

Por otro lado, el CPP se inyectó en el ventrículo lateral

derecho 10 min después de administrar el RRu (1.5 nmolas en 0.1 μ l) en el hipocampo. Las coordenadas estereotaxicas que se usaron para la inyección intraventricular fueron: 0.8 mm posterior a bregma, 1.7 lateral y 3.9 vertical (Paxinos, 1986). El CPP se administró disuelto en una solución de NaCl al 0.9% y en una concentración de 0.1 y 0.4 μ g/ 5 μ l. Los animales control fueron inyectados con el RRu en el hipocampo y posteriormente con solución salina en el ventrículo.

Procedimiento por el que se procesó el área CA₁ del hipocampo para observar al RRu a través de microscopía electrónica.

El RRu se inyectó en el área CA₁ del hipocampo de la rata como se describe en el manuscrito. Este estudio se efectuó en diferentes grupos de ratas que se perfundieron a los 10, 25, 40, y 130 minutos después de la inyección intrahipocampal del colorante. Las ratas se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con una mezcla de glutaraldehído (1%) y formaldehído (1%) que se disolvió en amortiguador de fosfatos 0.12 M (pH 7.4).

Una vez extraídos los cerebros, se disecó el área CA₁ del hipocampo inyectado y el contralateral. Posteriormente, las porciones de tejido que medían aproximadamente 0.5 mm² permanecieron por 2 horas inmersas en una solución de glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos 0.12 M (pH 7.4) a 4 °C. El tejido se transfirió a una solución de lavado hecha a base de sacarosa (0.25 M) en el mismo amortiguador de fosfatos, y se dejó en esta solución toda la noche a 4 °C. La sección del hipocampo se postfijó en frío durante 2 horas con tetróxido de osmio (2%) en amortiguador de fosfatos. Posteriormente, el tejido

se lavó en frío con la solución de lavado que se indicó anteriormente y se deshidrató con soluciones alcoholicas de concentración creciente a 4 °C.

A partir de este paso, el procesamiento del tejido se efectuó a temperatura ambiente. Las fracciones de tejido se infiltraron con óxido de propileno y se incluyeron en la resina. Finalmente, el tejido se cortó y se contrastó con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo. Algunos cortes no se contrastaron para evitar que el plomo o el uranilo contribuyeran a la formación de algún precipitado que se confundiera con los acúmulos del RRu. Las fracciones del área CA₁ que se obtuvieron de los animales inyectados con azul de pontamina se procesaron de la misma manera.

Procedimiento para observar a través de microscopía óptica los efectos que produce el RRu a largo plazo.

Al cabo de 9 días de la inyección del RRu, los cerebros de las ratas tratadas se perfundieron con el formaldehído al 10 % que se encontraba disuelto en una solución de NaCl (0.9 %). Posteriormente, los cerebros se incluyeron en parafina y se cortaron en un plano coronal con un microtomo manual. Las secciones coronales (15 µm) se montaron en portaobjetos y se tiñeron con Luxol azul rápido y violeta de cresilo.

Procedimiento para la inyección del RRu sobre la corteza cerebral de la rata.

Este acercamiento experimental se efectuó para probar que la internalización del RRu, no se propicia por el daño mecánico que

se produce al introducir la aguja de inyección en una estructura cerebral como el hipocampo.

El RRu se inyectó en la superficie de la corteza cerebral con ayuda de un aparato estereotáxico. Inicialmente, las ratas se anestesiaron con halotano en una mezcla de bióxido de carbono (95%) con oxígeno (5%). En todos los casos, la duramadre se retiró cuidadosamente para facilitar la colocación de la aguja de inyección sobre la corteza cerebral. Posteriormente la punta de la aguja se colocó en la superficie de la corteza frontal.

El RRu se usó en una concentración de 4.5 nmolas en 0.3 μ l. Una vez administrado el colorante, se dejaron transcurrir 10 min para que difundiera el compuesto. Después, las ratas se perfundieron como se describió anteriormente para observar al RRu. La perfusión de los cerebros se efectuó inmediatamente (n=3), así como, 15 min (n=3) después de desmontar a las ratas del aparato estereotáxico. El procesamiento de los cerebros se efectuó de la misma manera como se indicó para la identificación microscópica del RRu en el hipocampo.

Resultados de los experimentos que no se incluyen en el artículo

Efecto de los antagonistas del receptor tipo NMDA sobre la conducta de SPM que produce el RRU.

Con base en los experimentos que se describen en el manuscrito, se determinó que la conducta de SPM que produce el RRU está mediada por la activación de circuitos serotoninérgicos.

Sin embargo, dado que las alteraciones conductuales que se observaron son propias de la epilepsia límbica en la rata, se consideró que el efecto primario que ejerce el RRU es el aumento de la excitabilidad cerebral.

De este modo, se decidió administrar algunos antagonistas del receptor tipo NMDA, para determinar si cuando se deprime la excitación se puede prevenir la generación de la conducta de SPM, que finalmente estaría dada por la activación secundaria de receptores serotoninérgicos.

Paradójicamente, el APH y el CPP incrementaron la frecuencia de SPM cuando se administraron junto con el RRU en el hipocampo (Fig. 1). El primero de estos antagonistas aumentó el número de SPM en un 185 %, y el segundo en un 218 % durante los primeros 90 min de observación. El incremento producido por estos antagonistas en el tiempo total de observación (180 min) fué del 243 % y 162 % respectivamente. De igual manera, el MK-801 tendió a incrementar el número de sacudidas en los primeros 90 minutos de observación (157 %), así como, en el tiempo total (199 %) (Fig. 1).

Los animales inyectados únicamente con los antagonistas no

mostraron ninguna alteración en su conducta (n=3).

Por el contrario, el CPP disminuyó notablemente la frecuencia de SPM cuando se administró en el ventrículo lateral después de inyectar el RRu en el hipocampo (Fig. 2). Este compuesto (0.1 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) produjo una disminución de la conducta de aproximadamente el 80% durante los primeros 90 min de observación en 6 de 8 ratas tratadas. En los restantes 2 animales la frecuencia de la conducta no cambió (65.5 ± 11.5) con respecto a los controles. Por otro lado, el CPP en una concentración de 0.4 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ disminuyó la conducta en un 80% en las 4 ratas tratadas durante el mismo tiempo de observación.

En el tiempo total de observación (180 min) también se identificó la inhibición de la frecuencia de la conducta. Dicha frecuencia disminuyó en un 50% en los 6 animales en los que el CPP tuvo efecto durante los primeros 90 min. En los 2 animales restantes la frecuencia de la conducta fué semejante a la observada en los controles (227 ± 46). Por otro lado, el CPP en su concentración de 0.4 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ ejerció un efecto bloqueador del 50% en las 4 ratas tratadas. En los animales que fueron tratados con el CPP se observó un efecto de ataxia ligero que no restringió la actividad voluntaria de los mismos.

Localización del RRu (por medio de microscopía electrónica) en las neuronas hipocampales.

El RRu es un colorante policatiónico que interactúa con glicoproteínas y glicolípidos de las membranas celulares (Luft, 1971). Dada esta propiedad, dicho colorante se ha empleado en microscopía electrónica para teñir membranas de diferentes tipos

celulares (Luft, 1971).

Paradójicamente, en este trabajo se observó que el RRU se internaliza rápidamente en las células nerviosas y ocasiona la degeneración celular (Fig 3B).

Un hecho importante que es necesario hacer notar es la preferencia que tiene el colorante por acumularse dentro del nucleolo, y en menor grado en el citoplasma de las neuronas hipocampales (Figs. 3B y 4A). Además, son estas estructuras más receptivas las que degeneran rápidamente. Por tal motivo, la degeneración celular se identificó preferencialmente en las porciones del sector CA₁ en las que los somas neuronales se encuentran conglomerados (Figs 3B y 4A). En repetidas ocasiones se observó que los somas se retraen y la cromatina nuclear se disgrega en las neuronas en proceso de degeneración (Figs. 3B y 4A).

Especialmente en las etapas tardías de la inyección del compuesto, se identificaron numerosas vacuolas nucleares (Fig 4A) e intracitoplásmicas que remarcan la degeneración de las células que las contienen. La vacuolización citoplásmica se produjo posiblemente por el hinchamiento del retículo endoplásmico y/o del aparato de Golgi.

En contraste, la estructura del neurópilo se conservó semejante a la observada en el hipocampo contralateral al inyectado (Fig. 4B). Además, en estas porciones del área CA₁, las terminales sinápticas aparecieron abundantes y sin acumulación del colorante aún a las 2 horas después de la inyección del RRU (Fig 4B).

Los cambios estructurales antes mencionados se identificaron en las porciones del sector CA₁ que se aislaron a los 10 min después de la inyección del colorante (Fig 3B), hasta las etapas más tardías que fueron estudiadas (Fig 4A).

En el área CA₁ hipocampal que fué inyectada con el azul de pontamina no se identificaron las alteraciones descritas con anterioridad (dato no mostrado). En esta situación los somas neuronales permanecieron como los observados en el hipocampo contralateral al inyectado con RRu (dato no mostrado).

Descripción de los efectos que produce el RRu a largo plazo en el hipocampo.

En esta serie de experimentos se observó que las neuronas piramidales degeneran completamente en el sector CA₁ del hipocampo (n=4). Apparently la degeneración neuronal se restringió a el hipocampo derecho que fué inyectado con el colorante. Además, la zona en la que se encontraban las neuronas degeneradas fué invadida por células gliales reactivas (Fig. 5).

Localización del RRu en la corteza cerebral a través de microscopía óptica y electrónica.

Al observar las secciones coronales de los cerebros en los que el RRu se aplicó sobre la corteza cerebral, se identificó que dicho compuesto se concentra dentro de los cuerpos celulares tal como se describió en el hipocampo (Fig. 6). Dicho hallazgo sugiere que la internalización del RRu no se debe a la lesión que se produce al introducir la aguja de inyección en el cerebro.

En las porciones de la corteza que fueron procesadas para su

observación en el microscopio electrónico, se identificó nuevamente que el RRu se acumula en el nucleolo así como en el citoplasma de los somas neuronales (dato no mostrado). En estas preparaciones se pudo identificar con gran claridad la asociación del colorante a las membranas del núcleo (dato no mostrado). Al igual que en el hipocampo, fué evidente la degeneración de los cuerpos celulares y la preservación de las zonas ricas en terminales nerviosas (dato no mostrado).

Fig. 1 Efecto de los antagonistas del receptor que reconoce al NMDA sobre la frecuencia de SPM que produce el RRU (1.5 nmolas en 0.1 μ l). Los diferentes antagonistas se administraron junto con el RRU en el área CA₁ del hipocampo. Las barras representan el número promedio \pm error standar de las SPM que se cuantificaron durante los primeros 90 min y 180 min de observación. Los animales del grupo control se inyectaron únicamente con el RRU. En todos los casos, los antagonistas aumentaron la frecuencia de SPM con respecto al grupo control (n=10). El APH (n=7; p < 0.05) y el CPP (n=4; p < 0.01) incrementaron significativamente la frecuencia de la conducta en el primer intervalo de tiempo. Asimismo, el APH aumentó significativamente el número de SPM en el tiempo total de observación (p<0.01).

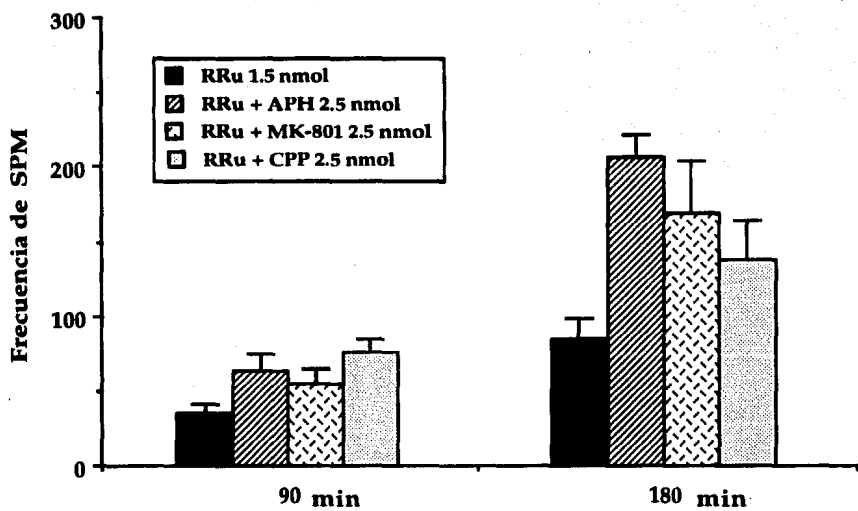


Fig. 2 Efecto de la administración intracerebroventricular (i.c.v.) del CPP (0.1 y 0.4 μg en 0.5 μl) sobre la frecuencia de SPM que produce el RRU (1.5 nmolas en 0.1 μl , i. h.). Cada barra representa el número promedio \pm error estandar de SPM que se cuantificaron en los períodos de tiempo que se señalan en el eje de las abscisas. Los animales del grupo control se inyectaron con el RuR (i. h.) y posteriormente con solución salina (NaCl al 0.9%) en el ventrículo lateral (n=6). En la segunda barra de cada grupo se muestra la frecuencia promedio de SPM que se obtuvo, en las 6 ratas de un total de 8 tratadas en las que se observó la inhibición de la conducta por acción del CPP (0.1 μg). Las diferencias estadísticas entre el grupo control y los tratados con el antagonista se valoraron de acuerdo a la prueba t-Student. El grado de significancia durante los primeros 90 min fué de $p < 0.01$ y en los 180 min de observación correspondió a $p < 0.05$. El CPP en una concentración de 0.4 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ (i. c. v.) disminuyó significativamente la frecuencia de la conducta en los 90 min de registro ($p < 0.02$) y en el tiempo total ($p = 0.05$).

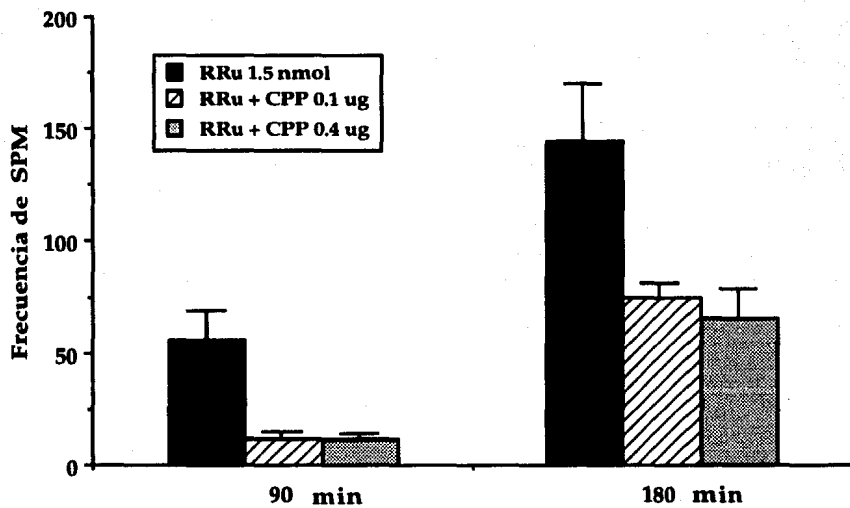


Fig. 3 Efecto neurodegenerativo que produce el RRu en el área CA₁ del hipocampo. En A se muestra la estructura preservada de una de las regiones ricas en cuerpos celulares que se identificó en el área CA₁ contralateral a la inyectada. Esta micrografía fué tomada de una de las porciones del hipocampo que se aislaron a los 25 min después de la inyección del colorante. En B se muestra el grado de degeneración celular que se observó a los 10 min después de la inyección i. h. del RRu. Nótese que en las células que contienen al RRu, la cromatina se encuentra disgregada y algunas vacuolas son evidentes en la porción nuclear.

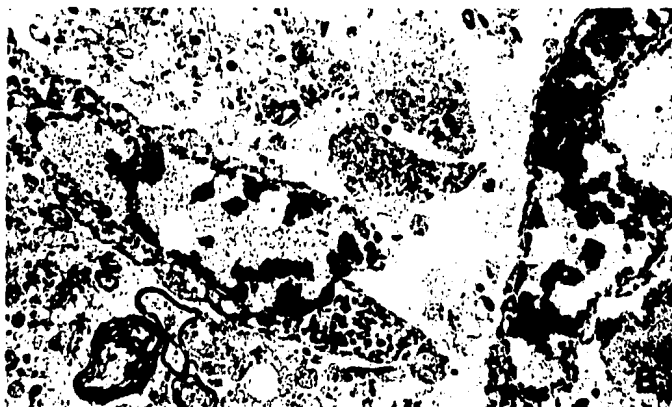
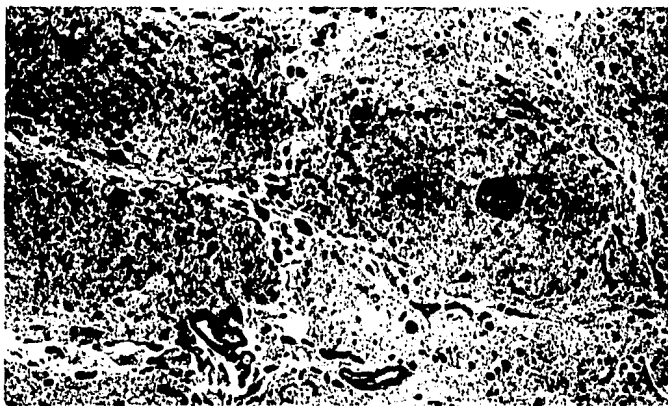
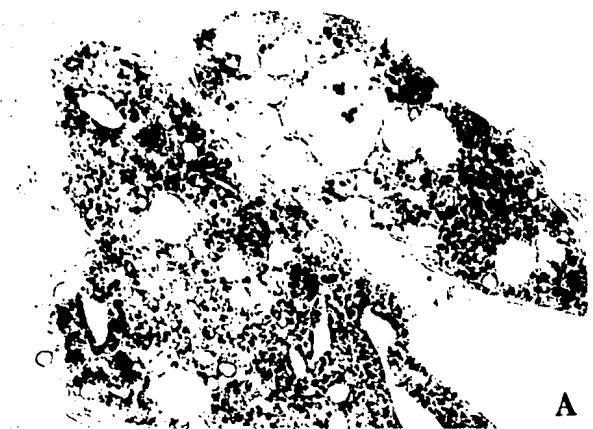


Fig. 4 Representación de una de las zonas en las que se identificaron a los cuerpos celulares degenerados (A), y al neurópilo (B) en el área CA₁ inyectada. En A se muestra la acumulación del RRu dentro del nucleolo y la vacuolización altamente desarrollada a los 130 min después de la inyección i.h. del compuesto. (B) Estructura de una de las zonas con abundantes terminales sinápticas que se visualizó dentro del área CA₁ que contenía a las regiones somáticas degeneradas. Las flechas en B señalan algunas sinapsis que aparentemente no contienen al RRu. El tejido se aisló a los 130 min después de la inyección del RRu.



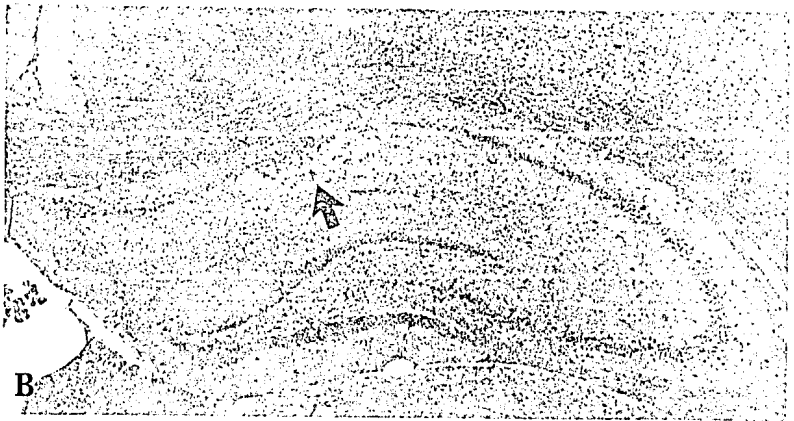
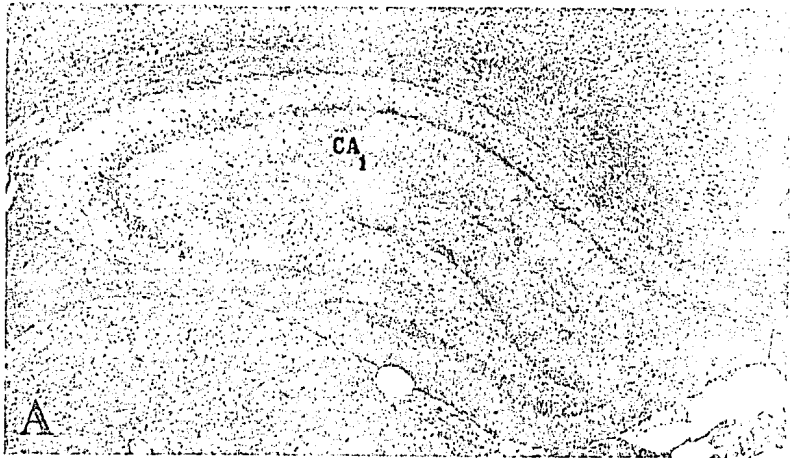
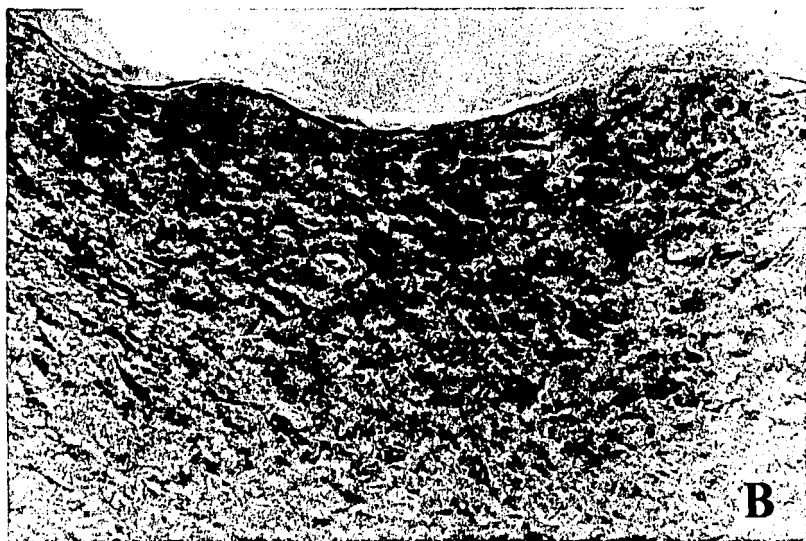
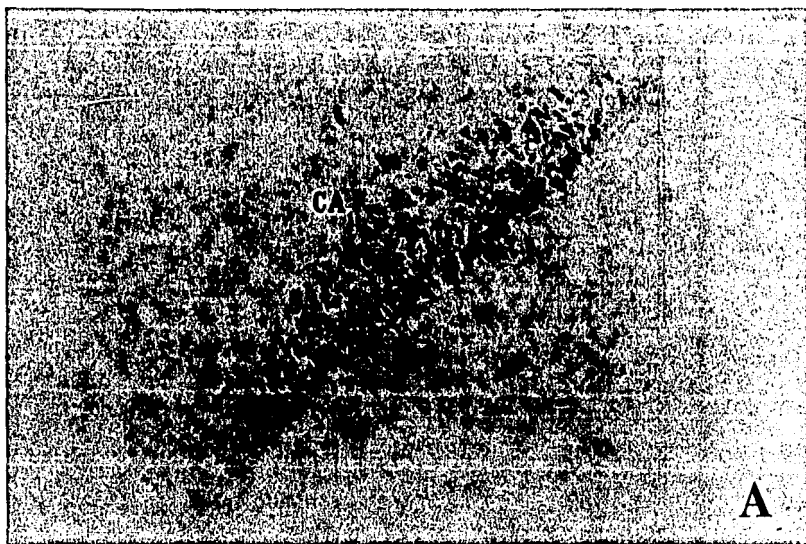


Fig. 5 Degeneración del estrato piramidal del área CA₁ que se observó al 90 día de la inyección i. h. del RRu. En el corte coronal del hipocampo que fué inyectado con el colorante (B) se identifica la despoblación neuronal y, en consecuencia, la proliferación de células gliales. La flecha en B señala al sector CA₁ del hipocampo derecho ya degenerado. El estrato piramidal se mantiene íntegro en el hipocampo contralateral al inyectado (A).

Fig 6 Distribución del RRu en el área CA₁ del hipocampo (A) y la corteza cerebral (B) de la rata. En A y en B se observa que el colorante se encuentra preferentemente dentro de los somas de las neuronas. Esta tinción específica se identificó a los 25 min después de la inyección intrahipocampal del RRu (A), así como, a los 30 min después de depositar la gota del colorante sobre la corteza cerebral. La distribución del RRu que se muestra en A fué descrita en el manuscrito y únicamente se muestra con el fin de compararla con la que se identificó en la corteza (B).



DISCUSION GENERAL

Efectos conductuales que produce el RRu

En este trabajo se caracterizó que el RRu produce epilepsia parcial de naturaleza límbica cuando se administra en el hipocampo de la rata. Este hecho se determinó al observar las mismas conductas que desencadenan otros fármacos que producen este tipo de epilepsia (Ben-Ari et al., 1981; Lothman y Collins, 1981).

Con base en la caracterización de dichos trastornos conductuales, se sugirió que el RRu inicialmente incrementa la excitabilidad del hipocampo, la cual se puede propagar de un modo secundario a otras áreas cerebrales. Sin embargo, no se pudo demostrar que tal efecto es el resultado de la desinhibición de las neuronas piramidales de esta estructura, que estaría promovida por la disminución de la liberación del GABA. Dado que la mayoría de los transmisores se liberan a través de un mecanismo dependiente de calcio, se podría pensar que el RRu estuviera bloqueando la liberación de otro neurotransmisor. Sin embargo, el RRu no se identificó unido a las terminales sinápticas (Fig. 4B), por lo que, proponer que el efecto convulsivante se debe a la inhibición del proceso fisiológico arriba mencionado resulta dudoso. En cambio se observó que el RRu penetra a los somas neuronales y los destruye, lo cual parece ser la causa que desencadena las conductas de carácter epiléptico.

Dada la vasta cantidad de interconexiones que se establecen entre el hipocampo y otras estructuras cerebrales (Bayer, 1985),

resulta altamente probable que la hiperexcitabilidad se propague hacia otras áreas.

En la epilepsia que se provoca por la administración del ácido kaínico (Ben-Ari et al., 1981; Lothman y Collins, 1981) o por la estimulación eléctrica de áreas límbicas (Collins et al., 1983), se ha observado que las alteraciones conductuales propias de esta patología, se van manifestando conforme la actividad eléctrica anormal se propaga a ciertas estructuras extralímbicas (Fig. 7).

Lothman y Collins (1981) describieron que la epilepsia que se inicia en el hipocampo, se propaga en primer lugar a otras estructuras límbicas (estructuras secundarias; Fig. 7). Durante esta etapa se presenta el automatismo y las convulsiones límbicas moderadas. Este tipo de convulsiones se reconoce por la presencia de sacudidas mioclónicas de la cabeza y las extremidades superiores de la rata. Por otro lado, el automatismo incluye a ciertas conductas motoras estereotipadas que se observan esporádicamente en la rata intacta (sacudidas de la cabeza, temblor de vibrisas, parpadeo y movimientos de la mandíbula).

Posteriormente, las convulsiones límbicas severas se presentan cuando la actividad anormal se registra también en estructuras extralímbicas (tálamo, sustancia nigra) (estructuras terciarias; Fig. 7). Estas convulsiones se identifican por la presencia de una conducta que se conoce como "rearing" y que se asocia con clonías bilaterales de las extremidades superiores de la rata (Lothman y Collins, 1981). Las SPM suelen presentarse ya sea durante la fase clónica o después de que se presenta una descarga eléctrica anormal (Lothman y Collins, 1981). Cabe

resaltar que todas estas anomalías conductuales se presentaron en las ratas inyectadas con el RRu, por lo que probablemente se activaron las mismas estructuras que se señalan en la Fig. 7.

Durante esta patología se activan los circuitos neuronales glutamatérgicos, que en su mayoría son los responsables de propagar la actividad epiléptica, y aquellos que modulan la excitabilidad cerebral. Dentro de estos últimos, principalmente encontramos a las proyecciones serotoninérgicas que parten del núcleo del Rafé, y a las vías noradrenérgicas que se originan en el locus coeruleus. De hecho, estos circuitos participan de un modo importante en la regulación de la intensidad de las crisis epilépticas (Calderini et al., 1978; Callaghan y Schwark, 1979; Jobe y Laird, 1981; Jobe et al., 1982).

Como se puede observar en la Fig. 7, la mayoría de las estructuras que se activan durante este tipo de epilepsia reciben aferentes serotoninérgicas. Sin embargo, los receptores 5-HT₂ son poco abundantes en las estructuras límbicas que se denotan en esta figura.

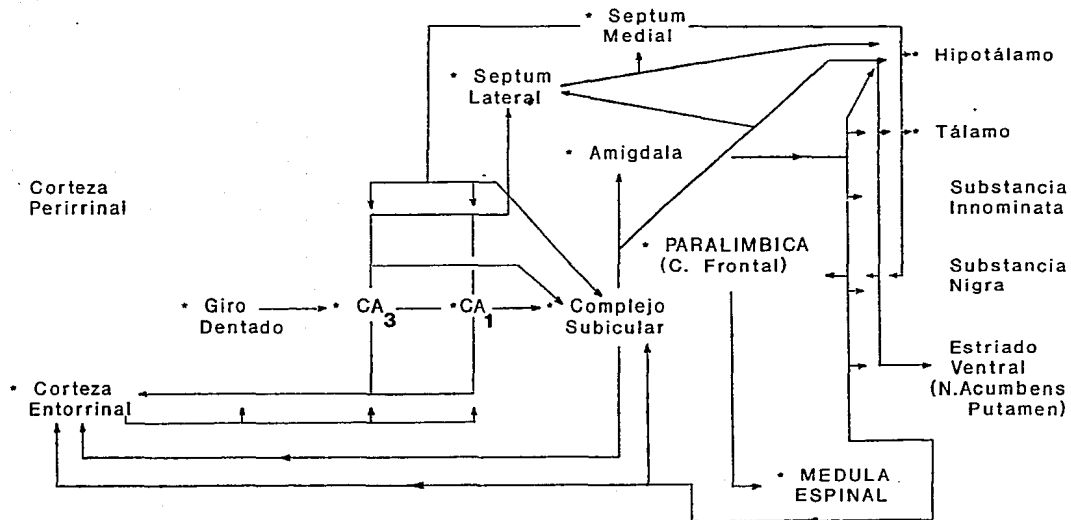
En este trabajo se valoró la participación de la transmisión serotoninérgica que está mediada por los receptores tipo 2, y se sugirió que probablemente los receptores que se localizan en áreas motoras son los responsables de modular la expresión de esta conducta. De hecho, se ha evaluado la posible participación de los receptores 5-HT₂ que se localizan en la corteza frontal y sobre las neuronas motoras de la médula espinal (Koshikawa et al., 1985a, 1985b; Koshikawa et al., 1989).

Fig. 7 Esquema en el que se señalan las estructuras cerebrales que se activan durante la epilepsia límbica, y las vías a través de las cuales se puede propagar la excitación. Durante la primera etapa de la epilepsia se activa el hipocampo y el septum lateral. Las convulsiones límbicas moderadas (CONV. LIMB. MOD.) se presentan una vez que la actividad anormal se propaga a la corteza entorrinal, la amígdala, el complejo subicular y el septum medial (estructuras secundarias). Finalmente, se activan algunas áreas extralímbicas y aparecen las convulsiones límbicas severas (CONV. LIMB SEV.). En la parte inferior se indica que las SPM aparecen asociadas con las conductas propias de este tipo de epilepsia. Los asteriscos denotan a las estructuras que reciben proyecciones serotoninérgicas desde el núcleo del Rafé. El complejo subicular se considera como una entidad que involucra al subículo, presubiculo y parasubiculo. La corteza paralímbica incluye a la corteza perirrinal, frontal, cingulada, retrosplenial e infralímbica medial. Diagrama modificado de Lothman y Collins, 1981).

ESTRUCTURAS LIMBICAS		ESTRUCTURAS EXTRALIMBICAS	
CORTICALES	SUBCORTICALES	CORTICALES	SUBCORTICALES

HIPOCAMPALES

EXTRAHIPOCAMPALES



SPM - AUTOM. - CONV. LIMB. MOD.

SPM - CONV. LIMB. SEV.

A continuación se mencionarán algunas de las funciones que ejercen los receptores tipo 2 en el sistema nervioso. Se ha caracterizado que por lo menos hay dos tipos de receptores serotoninérgicos en el sistema nervioso central (Marsden et al., 1989). Uno de ellos, inhibe a las neuronas que los poseen (receptores tipo 1), mientras que, el segundo modula el efecto que producen los aminoácidos excitadores en el cerebro (receptores tipo 2) (Davis et al., 1987). A través de la activación de este último tipo, la serotonina facilita el efecto excitador que ejerce el glutamato sobre las motoneuronas faciales (Vander Maelen y Aghajanian, 1980). Asimismo, este transmisor puede facilitar la excitación de las motoneuronas espinales que se produce por la estimulación eléctrica de la corteza motora (Mc Call y Aghajanian, 1979). Aparentemente, los bloqueadores de los receptores 5-HT₂ suprimen este efecto que produce la serotonina (Davis et al., 1987; Peroutka, 1988). Además, Nedergaard y colaboradores (1986) demostraron que este transmisor facilita también la despolarización que produce el NMDA en las neuronas de las capas III, V y VI de la neocorteza del gato.

Estas observaciones han permitido sugerir que los trastornos motores que produce la serotonina, se pueden deber a la facilitación excesiva de las señales excitadoras que parten de la neocorteza hacia el tallo cerebral o hacia los núcleos motores espinales (Mc Call y Aghajanian, 1979 y 1980; Vander Maelen y Aghajanian, 1980). La vía glutamatérgica cortico-espinal se denota en la Fig. 7.

Tomando como base esta última idea, resulta probable que las

SPM se puedan suprimir al bloquear la excitación que está mediada por el ácido glutámico o aspártico, en la neocorteza y/o médula espinal, o al antagonizar a los receptores 5-HT₂ que modulan a las neuronas glutamatérgicas de estas estructuras. Este argumento se podría tratar de comprobar en estudios posteriores.

Los antagonistas del NMDA produjeron efectos diferenciales que dependieron de la vía de administración usada. El CPP disminuyó la frecuencia de las SPM, únicamente cuando se administró a través del ventrículo lateral, probablemente porque pudo actuar sobre las estructuras extrahipocampales antes mencionadas. Tal como se reporta en el manuscrito, el antagonista de los receptores 5-HT₂, la ketanserina, también tuvo un efecto supresor solamente cuando se administró por vía sistémica. Paradójicamente, los diferentes antagonistas del NMDA tendieron a incrementar el número de SPM cuando se inyectaron con el RRU en el hipocampo. Este efecto probablemente se produjo porque dichos antagonistas se pueden comportar como proconvulsivos.

El efecto proconvulsivo que ejercen los antagonistas del NMDA, se ha reportado en otros trabajos en los que la actividad epileptiforme del hipocampo, se genera por la aplicación de diferentes agentes convulsivantes (Collingridge et al., 1983; Dingledine et al., 1986; Neuman et al., 1988). Por ejemplo, el antagonista competitivo del NMDA, el APV, potencia la actividad epiléptica que produce la bicuculina o la picrotoxina (Dingledine et al., 1986). Neuman y colaboradores (1988) describieron también que los antagonistas competitivos del receptor del NMDA, el APV,

el APH y el CPP prolongan la duración de la actividad epileptiforme que produce el ácido kaínico en las rebanadas del hipocampo. Asimismo, el APH incrementa la frecuencia de las espigas de tipo epileptiforme que produce el péptido desgranulador de las células cebadas (Neuman et al., 1988). Por otro lado, el APV facilita la actividad unitaria que producen los ácidos quisquálico y kaínico en las neuronas del área CA₁ del hipocampo (Collingridge et al., 1983). En los trabajos antes mencionados se describió que los antagonistas del receptor tipo NMDA se comportan como proconvulsivos en ciertas concentraciones (nmolares) (Dingledine et al., 1986), o en función del isómero que se emplea (Collingridge et al., 1983).

Sobre la base de estos datos, es posible que como consecuencia de este efecto proconvulsivo que ejercen los antagonistas del NMDA, se haya incrementado la frecuencia de la conducta de SPM que ocurre en asociación con la actividad paroxística de estructuras límbicas. Por consiguiente, estos antagonistas se podrían aplicar en concentraciones diferentes a las que se emplearon en este trabajo, para determinar si éstos ejercen un efecto diferencial en función de la dosis usada.

Efectos que produce el RRU sobre la citoarquitectura del hipocampo

El RRU tiñe a las membranas de las células y los organelos que contienen polisacáridos ácidos (Luft, 1971 a, b). Se ha sugerido que el RRU no tiene la capacidad de internalizarse en las células, debido a las limitaciones estéricas que surgen cuando se une a la matriz extracelular del glicocalix (Snowdowne

y Howell, 1984). Además, se ha demostrado que este compuesto se une a la membrana sinaptosomal rápidamente (Tapia et al., 1985).

A través de la observación microscópica del tejido que fué inyectado con el RRu, en este trabajo se observó que el colorante penetra rápidamente a los somas de las neuronas del hipocampo y la corteza cerebral. En la literatura se han aportado evidencias de que este colorante se internaliza en las células del músculo esquelético (Howell, 1974) y nervios espinales (Singer et al., 1971), después de mantener a estas preparaciones en presencia del RRu por largos períodos de tiempo.

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo por el que el RRu penetra a las células, en otros trabajos se observó que este colorante se internaliza a través de un proceso de endocitosis. En estos estudios se identificaron algunas vesículas pinocíticas en las regiones próximas a los depósitos del colorante (Singer et al., 1971; Szubinska y Luft, 1971). En el presente trabajo no se visualizaron este tipo de estructuras, por lo que, la endocitosis no parece ser el mecanismo a través del cual el RRu se internaliza en las neuronas.

Resulta interesante resaltar que el RRu no se identificó en las mitocondrias. Esta observación también fué señalada en el trabajo realizado por Howell (1974) en el músculo esquelético. En dicho trabajo se observó que el RRu no se une a las membranas de las mitocondrias, a pesar de que el músculo permaneció por un largo período de tiempo en presencia del colorante.

El efecto degenerativo que ejerce el RRu en el hipocampo y la corteza cerebral, también se ha observado en algunos trabajos en los que se emplearon otras preparaciones biológicas.

Szubinka y Luft (1971) observaron que una solución diluída del colorante (550 ppm) degenera a las amibas en un lapso de tiempo menor a 1 hora.

Al analizar las causas del daño celular durante algunas patologías, se ha considerado que la ruptura del citoesqueleto puede ocasionar la necrosis celular (Siesjö et al., 1986). La ruptura del citoesqueleto puede ser promovida por la degradación de los neurofilamentos (a través de proteasas dependientes de calcio), o al ocasionar el desensamble de los microtúbulos (Siesjö et al., 1986). Tomando como base estos datos, es posible que el efecto degenerativo que ejerce el RRU sobre las neuronas, pueda deberse a la interacción del colorante con el sistema de microtúbulos. De hecho, se ha reportado que el RRU puede ocasionar el desensamble de los microtúbulos e inhibir el transporte axonal (Deinum et al., 1981).

Por otro lado, hay una gran cantidad de evidencias experimentales que sugieren que la degeneración celular se produce como consecuencia del incremento en la concentración intracelular del calcio (Siesjö et al., 1986). En el caso particular del presente estudio, tal evento puede estar interviniendo en el proceso neurodegenerativo que desencadena el colorante. De hecho, la pérdida del citoesqueleto que se observa en las células degeneradas, también se podría explicar por un aumento en los niveles intracelulares del catión divalente. Además, los cambios morfológicos que se producen en el área CA₁ por el efecto tóxico del calcio (Feig y Lipton, 1990), son muy parecidos a los que se visualizaron en el tejido que contenía

al RRu.

Un hallazgo interesante es que, las toxinas químicas que alteran la integridad de la membrana plasmática, degeneran a las células hepáticas por la acumulación de calcio en el interior celular. El paso de este catión a través de las membranas dañadas se ve impulsado por el gradiente electroquímico que existe en condiciones normales (Schanne et al., 1979). Si el RRu afecta a las membranas celulares por medio de un mecanismo desconocido, este evento podría explicar su fácil internalización y la posible participación del calcio en el proceso degenerativo.

Finalmente cabe resaltar que como consecuencia del efecto tóxico que produce el RRu en el hipocampo, el sector CA₁ carece de estructura neuronal y en su lugar se desarrollan numerosas células gliales.

Tal como se ha descrito en la isquemia cerebral (Kirino et al., 1990), las terminales sinápticas mantienen su integridad estructural en el área CA₁ del hipocampo. Probablemente estas terminales sinápticas que se preservan provienen del área CA₃. De hecho, la zona del hipocampo que contiene a las neuronas degeneradas recibe innervaciones del sector CA₃. Durante la isquemia, una vez que se destruyen las neuronas del área CA₃ con el ácido kaínico, también se degeneran las terminales presinápticas en el sector CA₁ (Kirino et al., 1990). Este último punto también podría ser objeto de estudio en un trabajo posterior.

REFERENCIAS

- Arauz-Contreras, J., Gómez-Plascencia J. y Feria-Velasco A. (1982) Induction of flaccid paralysis followed by seizure activity by means of general administration of ruthenium red to adult rats. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 13: 271-276.
- Andersen, P. O. (1987) Properties of hippocampal synapses of importance for integration and memory. En: *Synaptic Function*. G. M. Edelman, W. Einar Gall y W. Maxwell Cowan, eds. John Wiley & Sons, New York, pp. 403-429.
- Ault, B. y Nadler, V. (1983) Anticonvulsant-like actions of baclofen in the rat hippocampal slice. *Br. J. Pharmacol.* 78: 701-708.
- Ault, B., Gruenthal, M., Armstrong, D. R. y Nadler, J. V. (1986a) Efficacy of baclofen and phenobarbital against the kainic acid limbic seizure-brain damage syndrome. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239 (2): 612-617.
- Ault, B., Gruenthal, M., Armstrong, D. R., Nadler, J. V. y Wang, CH. M. (1986b) Baclofen suppresses bursting activity induced in hippocampal slices by differing convulsant treatments. *Eur J. Pharmacol.* 126: 289-292.
- Avoli, M. (1988) GABAergic mechanisms and epileptic discharges. En: *Neurotransmitters and cortical function. From molecules to mind*. M. Avoli, T. A. Reader, R. W. Dykes y P. Gloor, eds. Plenum Press, New York, pp. 187-205.
- Bakay, R. A. E. y Harris, A. B. (1981) Neurotransmitter, receptor and biochemical changes in monkey cortical epileptic foci. *Brain Res.* 206: 387-404.

- Bayer, SH. A. (1985) Hippocampal region. En: The rat nervous system. Vol. 1. G. Paxinos, ed. Academic Press, Sydney, pp. 335-352.
- Bedard, P. y Pycock, C. J. (1977) 'Wet-Dog' shake behaviour in the rat: a possible quantitative model of central 5-hydroxytryptamine activity. *Neuropharmacol.* 16: 663-670.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Ghilini, D. R. 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 (7): 1361-1391.
- Bormann, J. (1988) Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *TINS.* 11 (3): 112-116.
- Calderini, G., Carlsson, A. y Nordström, C-H. (1978) Monoamine metabolism during bicuculline-induced epileptic seizures in the rat. *Brain Res.* 157: 295-302.
- Callaghan, D. A. y Schwark, W. S. (1979) Involvement of catecholamines in kindled amygdaloid convulsions in the rat. *Neuropharmacol.* 18: 541-545.
- Collingridge, G. L., Kehl, S. J. y McLennan, H. (1983) The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA₁ neurons in vitro. *J. Physiol.* 334: 19-31.
- Collins, R. C., Tearse, R. G. y Lothman, E. W. (1983) Functional anatomy of limbic seizures: Focal discharges from medial entorhinal cortex in rat. *Brain Res.* 280: 25-40.
- Cotman, C. W., Monaghan, D. T., Ottersen, O. P. y Storm-Mathisen, J. (1987) Anatomical organization of excitatory amino acid

- receptors and their pathways. *TINS*. 10 (7): 273-279.
- Croucher, M. J., Collins, J. F. y Meldrum, B. S. (1982) Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. *Science*. 216: 899-901.
- Czuczwar, S. J. y Meldrum, B. (1982) Protection against chemically induced seizures by 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 83: 335-338.
- Davies, M. F., Deisz R. A., Prince, D. A. y Peroutka, S. J. (1987) Two distinct effects of 5-hydroxytryptamine on single cortical neurons. *Brain Res.* 423: 347-352.
- Deinum, J., Wallin, M., Kanje, M. y Lagercrantz, C. (1981) The effect of ruthenium red on the assembly and disassembly of microtubules and on rapid axonal transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 675: 209-213.
- Dichter, M. A. y Ayala, G. F. Cellular mechanisms of epilepsy: A status report. *Science*. 237: 157-237.
- Dingledine, R., Hynes, M. A. y King, G. L. (1986) Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in epileptiform bursting in the rat hippocampal slice. *J. Physiol.* 380: 175-189.
- Dingledine, R., McBain, CH. J. y McNamara, J. D. (1990) Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *TIPS*. 11: 334-338.
- Fagg, G. E., Foster, A. C. y Ganong, A. H. (1986) Excitatory amino acid synaptic mechanisms and neurological function. *TIPS*. 7(9): 357-363.
- Feig, Sh. y Lipton, P. (1990) N-metil-D-aspartate receptor activation and Ca²⁺ account for poor pyramidal cell

- structure in hippocampal slices. *J. Neurochem.* 55: 473-483.
- Fisher, R. S. (1989) Animal models of epilepsies. *Brain Res. Rev.* 14: 245-278.
- Frush D. P. y McNamara J. O. (1986) Evidence implicating dentate granule cells in wet dog shakes produced by kindling stimulations. *Exp. Neurol.* 92: 102-113.
- Gloor, P. y Fariello, R. G. (1988) Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy. *TINS.* 11 (2) 63-68.
- Grimes, L., McGinty, J., McLain, P., Mitchell, C., Tilson, H. y Hong, J. (1988) Dentate granule cells are essential for kainic acid-induced wet dog shakes but not for seizures. *J. Neurosci.* 8(1): 256-264.
- Handley, S. L. y Singh, L. (1986) Neurotransmitters and shaking behaviour-more than a 'gut bath' for the brain? *TIPS.* 7(8): 324-328.
- Hayashi, T. (1954) Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med.* 3: 183-192.
- Herron, C. E. y Forsythe, I. D. (1989) Hippocampal synaptic transmission: regulation of the NMDA receptor-mediated component. *Comp. Biochem. Physiol.* 93A (1): 203-210.
- Howell, J. N. (1974) Intracellular binding of ruthenium red in frog skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 62: 242-247.
- Huettnner, J. E. y Bean, B. P. (1988) Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: Selective binding to open channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55: 1307-1311.
- Isaacson R. L. y Lanthorn, T. H. (1981) Hippocampal involvement

in the pharmacologic induction of withdrawal-like behaviors.
Fed. Proc. 40 (5): 1508-1512.

Jobe, Ph. C. y Laird, H. E. Neurotransmitter abnormalities as determinants of seizure susceptibility and intensity in the genetic models of epilepsy. Biochem. Pharmacol. 30 (23): 3137-3144.

Jobe, Ph. C. Laird, H. E., Ho, K. K., Ray, T. y Dailey, J. W. (1982) Abnormalities in monoamine levels in the central nervous system of the genetically epilepsy-prone rat. 23: 359-366.

Johnson, J. W. y Ascher, P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature. 325: 529-531.

Kamino, K., Ogawa, M., Uyesaka, N. y Inouye, A. (1976) Calcium binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. IV Effects of ruthenium red on the co-operative nature of calcium-binding. J. Membrane Biol. 26: 345-356.

Karlsson, G., Pozza, M. y Olpe, H-R. Phaclofen: a GABA_B blocker reduces long-duration inhibition in the cortex. Eur. J. Pharmacol. 148: 485-486.

Kemp, J. A., Marshall, G. R. y Woodruff, G. N. (1986) Quantitative evaluation of the potencies of GABA-receptor agonists and antagonists using the rat hippocampal slice preparation. Br J. Pharmacol. 87: 677-684.

Kerr, D. I. B., Ong, J., Prager, R. H., Gynther, B. D. y Curtis, D. R. (1987) Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. Brain Res. 405: 150-154.

- Kirino, T., Tamura, A. y Sano, K. (1990) Chronic maintenance of presynaptic terminals in gliotic hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 510: 17-25.
- Koshikawa, F., Koshikawa N. y Stephenson, J. D. (1985a) Effects of antidepressant drug combinations on cortical 5-HT₂ receptors and wet-dog shakes in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 118: 273-281.
- Koshikawa, N., Maruyama, Y. y Stephenson, J. D. (1989) Production of wet-dog shakes in rats and down-regulation of spinal 5-HT₂ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 164: 595-598.
- Koshikawa, N., Smockum, R. W. J. y Stephenson, J. D. (1985b) Is waning of a 5-hydroxytryptamine (5-HT)-mediated syndrome due to 5-HT₂ receptor down-regulation?. *Neurosci. Lett.* 55: 279-282.
- Laird, H. E., Dailey, J. W. y Jobe, PH. C. (1984) Neurotransmitter abnormalities in genetically epileptic rodents. *Fed. Proc.* 43: 2505-2509.
- Lambert, J. D. C., Jones, R. S. G., Andreasen, M., Jensen, M. S. y Heinemann U. (1989) The role of excitatory amino acids in synaptic transmission in the hippocampus. *Comp. Biochem. Physiol.* 93A (1): 195-201.
- Le Gal La Salle, G. y Cavalheiro, E. A. (1981) Stimulation of septal and amygdaloid nuclei: EEG and behavioral responses during early development of kindling with special reference to wet dog shakes. *Exp. Neurol.* 74: 717-727.
- Lee, P. H. K., Obie, J y Hong, J. Sh. (1989) Opioids induce convulsions and wet dog shakes in rats: Mediation by

- hippocampal Mu, but not Delta or Kappa opioid receptors. *J. Neurosci.* 9(2): 692-697.
- Lerner-Natoli, M., Rondouin, G. y Baldy-Moulinier, M. (1984) Evolution of wet dog shakes during kindling in rats: comparison between hippocampal and amygdala kindling. *Exp. Neurol.* 83: 1-12.
- Leyssen, J. E., Geerts, R., Gommeren, W., Verwimp, M. y Van Gompel P. (1982) Regional distribution of serotonin-2 receptor binding sites in the brain and effects of neuronal lesions. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 256: 301-305.
- Lodge, D. y Johnson, K. M. (1990) Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. *TIPS.* 11 (2): 81-86.
- Lothman, E. W. y Collins, R. C. (1981) Kainic acid induced limbic seizures: Metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Res.* 218: 299-318.
- Louis, E. D., Williamson, P. D. y Darcey, T. M. (1987) Experimental models of chronic focal epilepsy: A critical review of four models. *Yale J. Biol. Med.* 60: 255-272.
- Luft, J. H. (1971a) Ruthenium red and violet I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.* 171: 347-368.
- Luft, J. H. (1971b) Ruthenium red and violet II. Fine structural localization in animal tissues. *Anat. Rec.* 171: 369-416.
- Lundh, H. (1978) Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. *Brain Res.* 153: 307-318.
- Luthra, R. y Olson, M. S. (1977) The inhibition of calcium uptake and release by rat liver mitochondria by ruthenium red. *FEBS Lett.* 81 (1): 142-146.

- Madeira, V. M. C. y Antunes-Madeira, M. C. (1974) Interaction of ruthenium red with isolated sarcolemma. *J. Membrane Biol.* 17: 41-50.
- Maguire, G., Maple, B., Lukasiewicz, P. y Werblin F. (1989) γ -Aminobutyrate type B receptor modulation of L-type calcium channel current at bipolar cell terminals in the retina of the tiger salamander. *Proc Natl. Acad. Sci.* 86: 10144-10147.
- Marsden, C. A., Sleight, A. J., Fone, K. C. F., Jonson, J. V., Crespi, F., Martin, K. F., Garrett, J. C. y Bennett, G. W. (1989) Functional identification of 5HT receptor subtypes. *Comp. Biochem. Physiol.* 93A (1): 107-114.
- Mayer, M. L. y Westbrook (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 28: 197-276.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L. y Guthrie, P. B. (1984) Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature.* 309: 261-263.
- McCall R. B. y Aghajanian, G. K. (1979) Serotonergic facilitation of facial motoneuron excitation. *Brain Res.* 169: 11-27.
- McCall, R. B. y Aghajanian, G. K. (1980) Pharmacological characterization of serotonin receptors in the facial motor nucleus: a microiontophoretic study. *Eur. J. Pharmacol.* 65: 175-183.
- McDonald, J. W. y Johnston, M. V. (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15: 41-70.

- Meldrum, B. S., Croucher, M. J., Badman, G. y Collins, J. F. (1983) Antiepileptic action of excitatory amino acid antagonists in the photosensitive baboon. *Papio papio*. *Neurosci. Lett.* 39: 101-104.
- Meza-Ruiz, G. y Tapia, R. (1978) [3 H]GABA release in synaptosomal fractions after intracranial administration of ruthenium red. *Brain Res.* 154: 163-166.
- Moore, C. L. (1971) Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by ruthenium red. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42: 298-305.
- Murphy S. N. y Miller, R. J. (1988) A glutamate receptor regulates Ca_{2+} mobilization in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8737-8741.
- Nedergaard, S., Engberg, I. y Flatman, J. A. (1986) Serotonin facilitates NMDA responses of cat neocortical neurons. *Acta Physiol. Scand.* 128: 323-325.
- Neuman, R., Cherubini, E. y Ben-Ari, Y. (1988) Epileptiform bursts elicited in CA_3 hippocampal neurons by a variety of convulsants are not blocked by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Brain Res.* 459: 265-274.
- Newberry, N. R. y Nicoll, R. A. (1984) Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells. *Nature.* 308: 450-452.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbert A. y Prochiantz, A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature.* 307: 462-465.
- Olsen, R.W. (1987) The γ -aminobutyric acid/benzodiazepine/barbiturate receptor-chloride ion channel complex of

- mammalian brain. En: Synaptic Function. G. M. Edelman, W. Einar Gall y W. Maxwell Cowan, eds. John Wiley & Sons, New York. 257-271pp.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney.
- Person, R. J. y Kuhn, J. A. (1979) Depression of spontaneous and ionophore-induced transmitter release by ruthenium red at the neuromuscular junction. Brain Res. Bull. 4: 669-674.
- Peters, S., Koh, J. y Choi, D. W. (1987) Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. Science. 236: 589-593.
- Piredda, S. y Gale, K. (1986) Anticonvulsant action of 2-APH and muscimol in the deep prepyriform cortex. Eur. J. Pharmacol. 120: 115-118.
- Rahamimoff, R. y Alnaes, E. (1973) Inhibitory action of ruthenium red on neuromuscular transmission. Proc. Nat. Acad. Sci. 70: 3613-3616.
- Reed, K. C. Bygrave, F. L. (1974) The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. Biochem. J. 140: 143-155.
- Reynolds, I. J. y Miller, R. J. (1988) Multiple sites for the regulation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor. Mol. Pharmacol. 33: 581-584.
- Ribak, CH. E., Harris, A. B., Vaughn, J. E. y Roberts, E. (1979) Inhibitory, GABAergic nerve terminals decrease at sites of focal epilepsy. Science. 205: 211-214.
- Richards, J. G., Schoch, P., Häring, P., Takacs, B. y Möhler, H.

- (1988) Strategies for raising antibodies against benzodiazepine receptors. En: Molecular Neuroanatomy, vol.10. F. W. Van Leeuwen, R. M. Buijs, C. W. Pool y O. Pach, eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 159-190 pp.
- Ross, S. M. y Craig, CH. R. (1981) γ -aminobutyric acid concentration, L-glutamate 1-decarboxylase activity, and properties of the γ -aminobutyric acid postsynaptic receptor in cobalt epilepsy in the rat. J. Neurosci. 1 (12): 1388-1396.
- Rovira, C., Ben-Ari, Y. y Cherubini, E. (1984) Somatic and dendritic actions of γ -aminobutyric acid agonists and uptake blockers in the hippocampus in vivo. Neuroscience. 12 (2): 543-555.
- Schanne, F. A. X., Kane, A. B., Young, E. E. y Farber, J. L. (1979) Calcium dependence of toxic cell death: A final common pathway. Science. 206: 700-702.
- Siesjö B. K., Ingvar, M. y Wieloch, T. (1986) Cellular and molecular events underlying epileptic brain damage. Annals New York Acad. Sci. 462: 207-223.
- Singer, M., Krishnan, N. y Fyfe, D. A. (1971) Penetration of ruthenium red into peripheral nerve fibers. Anat. Rec. 171: 375-390.
- Snowdowne, K. W. y Howell, J. N. (1984) Ruthenium red: differential effects on excitation and excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle. J. Muscle Res. Cell Mot. 5: 399-410.
- Soltész, I., Haby, M., Leresche, N. y Crunelli, V. (1988) The

- GABA_B antagonist phaclofen inhibits the late K⁺-dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurons. Brain Res. 448: 351-354.
- Sottocasa, G., Sandri, G., Panfili, E., Bernard, B. de, Gazzotti, P., Vasington, F. D. y carafoli, E. (1972) Isolation of a soluble Ca²⁺ binding glycoprotein from ox liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 808.
- Squillace K. M., Post, R. M. y Pert, A. (1980) Development of wet dog shakes during amygdala kindling in the rat. Exp. Neurol. 70: 487-497.
- Stone, T. W. y Burton, N. R. (1988) NMDA receptors and ligands in the vertebrate CNS. Prog. Neurobiol. 30: 333-368.
- Swartzwelder, H. S., Sutch, C.P. y Wilson, W. A. (1986) Attenuation of epileptiform bursting by baclofen: reduced potency in elevated potassium. Exp. Neurol. 94: 726-734.
- Szubinska, B. y Luft, J. H. (1971) Ruthenium red and violet III. Fine structure of the plasma membrane and extraneous coats in amoebae (*A. proteus* and *Chaos chaos*). Anat. Rec. 71: 417-425.
- Tapia, R. (1975) Biochemical Pharmacology of GABA in CNS. En: Handbook of Psychopharmacology, vol. 4. L. L. Iversen, HS. D. Iversen y S. H. Snyder, eds. Plenum Publishing Corp., New York, pp. 1-58.
- Tapia, R. (1982) Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in mice by 4-aminopyridine, guanidine and lanthanum. Neurosci. Lett. 30: 73-77.
- Tapia R., Arias, C. y Morales, E. (1985) Binding of lanthanum

- ions and ruthenium red to synaptosomes and its effects on neurotransmitter release. *J. Neurochem.* 45: 1464-1470.
- Tapia, R. y Meza-Ruiz, G. (1977) Inhibition by ruthenium red of the calcium-dependent release of [3 H]GABA in synaptosomal fractions. *Brain Res.* 126: 160-166).
- Tapia, R., Meza-Ruiz, G., Durán, L. y Drucker-Colin, R. (1976) Convulsions or flaccid paralysis induced by ruthenium red depending on route of administration. *Brain Res.* 116: 101-109.
- Thomson, A. M. (1989) Glycine modulation of the NMDA receptor/channel complex. *TINS.* 12 (9): 349-353.
- Tricklebank, M. D. (1985) The behavioural response to 5-HT receptor agonists and subtypes of the central 5-HT receptor. *TIPS.* 6 (10): 403-407.
- Turner, A. J. y Whittle, S. R. (1983) Biochemical dissection of the γ -aminobutyrate synapse. *Biochem. J.* 209: 29-41.
- VanderMaelen, C. P. y Aghajanian, G. K. (1980) Intracellular studies showing modulation of facial motoneurone excitability by serotonin. *Nature.* 287: 346-347.
- Vasington, F. D., Gazzoti, P. Tiozzo, R. y Carafoli, E. (1972) The effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 256: 43-54.
- Walaas, I. (1983) The hippocampus. En: *Chemical Neuroanatomy.* P. C. Emson, ed. Raven Press, New York. pp. 337-358.
- Watson, E. L., Vincenzi, F. F. y Davis, P. W. (1971) Ca^{2+} -activated membrane ATPase: Selective inhibition by ruthenium red. *Biochim. Biophys. Acta.* 249: 606-610.

- Wei, E. (1973) Brain lesions attenuating "wet shakes" behavior in morphine-abstinent rats. *Life Sci.* 12 (1): 385-392.
- Westbrook, G. L. y Mayer, M. L. (1987) Micromolar concentrations of Zn_{2+} antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature.* 328: 640-643.
- Wheal, H. V. (1989) Function of synapses in the CA_1 region of the hippocampus: their contribution to the generation or control of epileptiform activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 93A (1): 211-220.
- Yap, C. Y. y Taylor, D. A. (1982) Involvement of 5-HT₂ receptors in the wet-dog shake behaviour induced by 5-hydroxytryptophan in the rat. *Neuropharmacol.* 22 (7): 801-804.