



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LAS MICRONYECCIONES DE AP-7 Y NK-001 EN LA
FORMACION RETICULAR PONTINA DE LA RATA, SOBRE LAS
CRISIS EPILEPTICAS PROVOCADAS POR PENTILENTETRAZOL.

T E S I S
Que para obtener el título de
B I O L O G O
p r e s e n t a
JOAQUIN MANJARREZ MARMOLEJO



Director de Tesis: DR. RAÚL H. ALVARADO CALVELLO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

M. en C. Virginia Abria Estela
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicación a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"EFECTO DE LAS MICROINYECCIONES DE AP-7 Y MK-801 EN LA FORMACION
RETICULAR PONTINA DE LA RATA, SOBRE LAS CRISIS EPILEPTICAS PROVOCADAS
POR PENTILENTETRAZOL".
realizado por JOAQUIN MANJARREZ MARMOLEJO

con número de tesis 7623707-8 , presente de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Agradecemos

Director de Tesis
Propietario DR. RAUL ALVARADO CALVILLO
Propietario DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
Propietario BIOL. JUAN CARLOS ZANORA CUNNINGHAM
Suplente M. en C. VIKTOR JAVIER ROMERO DIAZ
Suplente DR. MARCO ANTONIO SANCHEZ RAMOS

E. Abria Estela
J. Manjarrez Marmolejo
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS**

[Firma]
M. en C. MANJARREZ MARTINEZ MENA DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

DEDICATORIA

ESTE TRABAJO LO DEDICO CON TODO CARIÑO Y RESPETO A:

***JOAQUÍN
DÁMARIS E.***

**QUE SON EL GRAN MOTIVO QUE TENGO PARA SEGUIR ADELANTE; A USTEDES HIJOS
PORQUE ALGÚN DÍA PUEDAN HACER ALGO PARECIDO A ESTO O MEJOR.
Y RECUERDEN QUE SU PADRE LOS QUIERE MUCHO.**

**Y A TODAS LAS DEMÁS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA FORMA HAN COLABORADO EN
MI VIDA, QUE SON DEMASIADOS, GRACIAS.**

A G R A D E C I M I E N T O S

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Fisiología de la Formación Reticular, dependiente del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Deseo agradecer al Dr. Raúl Alvarado Calvillo, por la oportunidad y dirección dada durante mucho tiempo para la realización de este trabajo.

A las siguientes personas por su tiempo invertido en la revisión de esta tesis:

**Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
M. en C. Viktor J. Romero Díaz
Biologo Juan Carlos Zamora Cunningham**

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
LA EPILEPSIA Y SUS CAUSAS	4
CLASIFICACION CLINICA DE LAS CRISIS EPILEPTICAS	4
EPILEPSIA Y ELECTROENCEFALOGRAFIA	5
MODELOS ANIMALES DE EPILEPSIA	7
PENTILENTETRAZOL	10
FARMACOS ANTIEPILEPTICOS	12
AMINOACIDOS EXCITADORES Y EPILEPSIA	13
EL GLUTAMATO Y EL ASPARTATO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	13
SUBTIPOS DEL RECEPTOR DE GLUTAMATO	15
EL RECEPTOR NMDA	16
ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR A NMDA Y EPILEPSIA	18
ANTAGONISTAS COMPETITIVOS	18
ANTAGONISTAS NO-COMPETTIVOS	19
EL MK-801	20
FORMACION RETICULAR Y EPILEPSIA	21
ANATOMIA DE LA FORMACION RETICULAR	23
PROYECCIONES HACIA LOS NUCLEOS CRANEALES MOTORES	25
VIAS DESCENDENTES DE LA FR DEL TALLO CEREBRAL	25
FORMACION RETICULAR PONTINA	26
OBJETIVOS	30
METODOLOGIA	31
TECNICA DE IMPLANTACION	31
FASE EXPERIMENTAL	32
RESULTADOS	34
VALORACION CONDUCTUAL	34
GRUPO I : MICROINYECCION DE SALINA	34
GRUPO II : MICROINYECCION DE AP-7	35
GRUPO III : MICROINYECCION DE MK-801	35
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFIA	48

RESUMEN

Aproximadamente el 1% de la población mundial sufre de epilepsia, de este porcentaje aproximadamente el 25% presenta crisis epilépticas resistentes a los fármacos antiepilépticos de uso común en la terapia anticonvulsiva, por lo que estos pacientes incontrolables son candidatos a la intervención quirúrgica. Se han realizado diferentes estudios empleando modelos experimentales de crisis provocadas con sustancias químicas o con diferentes tipos de estimulación, buscando estructuras cerebrales que pudieran regular el inicio y la propagación de éstas. Actualmente se han estado realizando estudios que van dirigidos hacia la investigación de los mecanismos moleculares por medio de los cuales se producen las crisis y se ha comprobado que el desbalance entre la inhibición y la excitación, favoreciéndose esta última, da como resultado la sobreestimulación de vías que tienen un bajo umbral produciendo las características clínicas y conductuales observadas en animales y en el paciente epiléptico. También se ha encontrado que los aminoácidos excitadores como el glutamato y el aspartato tienen un papel importante en la génesis de las crisis epilépticas y se están realizando estudios con fármacos que actúen bloqueando la transmisión a nivel postsináptico sobre los receptores del glutamato y aspartato en forma más dirigida. El objetivo central de este trabajo es valorar el papel de los antagonistas del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) de tipo competitivo y no-competitivo en la Formación Reticular Pontina (FRP) sobre la iniciación y propagación de las crisis epilépticas inducidas por la inyección sistémica de pentilentetrazol. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250-300 g., se les implantó una cánula guía dirigida hacia la FRP, 2 electrodos en la corteza motora para registro del electroencefalograma (EEG), siete días después de la cirugía se formaron 3 grupos con microinyección en la FRP; al primero se le aplicó solución salina al 0.9% (grupo control), al segundo ácido 2-amino-7-fosfonoheptanoico (AP-7) 9.0 nMol y al tercero, 5R,10S-(+)-5-metil-10,11-dihidro-

5H-dibenzo[a,d]cicloheptén-5,10-imina (MK-801) 6.0 nMol, todas en un volumen de 0.2 μ l, se registró el EEG y se valoró la conducta durante 30 minutos. Después se les inyectó Pentilentetrazol (PTZ) a una dosis de 70 mg/kg. i.p. para provocar la aparición de crisis tónico-clónicas generalizadas (CTCG), se registró el EEG y se valoró la conducta durante 90 minutos. Una vez terminada la fase experimental a los animales se les inyectó colorante azul de pontamina (0.2 μ l), se perfundieron con formol al 10% y se les extrajo el cerebro para localizar el sitio de inyección. Para los tres grupos se analizó la latencia a la primer CTCG, expresada en promedios de minutos \pm el error estándar, el porcentaje de retardo y de supresión de las CTCG. El análisis estadístico se realizó con un análisis de varianza de un factor entre el grupo control y los 2 experimentales con la prueba de Tukey, una ji cuadrada (X^2) y una t de Student. Los resultados obtenidos muestran que el AP-7 (antagonista competitivo del receptor NMDA) no modificó estadísticamente la latencia (salina = 1.9 ± 0.5 min; AP-7 = 6.6 ± 3.6) ni suprimió las CTCG ya que el 100% de los animales las presentó. Con el MK-801 se obtuvo un aumento estadísticamente significativo en la latencia a la aparición de las CTCG respecto al grupo control (salina 1.9 ± 0.5 min; MK-801 46.6 ± 11.9 min; ANOVA = 7.95; $p < 0.0021$), en este grupo se encontró que en 5 de 12 animales no se presentó ninguna manifestación de crisis por lo que se les asignó una latencia de 90 min, que fue el tiempo que duró el estudio. También se analizó la latencia a la aparición de la primer CTCG contando sólo a los animales que sí presentaron CTCG (salina = 1.9 ± 0.5 min; MK-801 = 15.6 ± 20.68 min; $t = -1.88$; $p < 0.004$, este cambio es estadísticamente significativo. También se presentó una supresión significativa del 42% de las CTCG ($X^2 = 97.7$, $p < 0.001$) respecto al grupo control. Estos datos nos indican que probablemente la FRP es un sitio blanco de los antagonistas del receptor NMDA, y que los antagonistas no-competitivos tienen un papel importante en el inicio y la propagación de las crisis convulsivas.

INTRODUCCION

Desde los trabajos de Loewi en 1921, se ha aceptado que las neuronas se comunican tanto entre sí como con los sitios blanco que pueden ser otra neurona, un músculo o una glándula ejerciendo control sobre estos por medio de sustancias químicas denominadas neurotransmisores. Dichos neurotransmisores se sintetizan y almacenan en la terminal presináptica, son liberados en el espacio extracelular para posteriormente interactuar con sus receptores específicos los cuales se encuentran localizados en la membrana postsináptica disparando así cambios eléctricos o bioquímicos en la célula postsináptica. Las funciones básicas del sistema nervioso, incluyendo el procesamiento de la información sensorial y el control de la musculatura, dependen de la rapidez con que viajan las señales a través de circuitos neuronales los cuales están distribuidos en forma tan precisa que crean mapas topográficos con significado fisiológico. La información que fluye a través de estas vías es mediada por los neurotransmisores excitadores e inhibidores que producen cambios en la conductancia iónica que dura sólo unos milisegundos. Los principales neurotransmisores involucrados en la inhibición o excitación neuronal son: el ácido γ -amino butírico (GABA) que es el principal neurotransmisor inhibidor del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos (Roberts et al, 1976) y el Glutamato (Glu) que es el principal aminoácido encargado de la excitación en el SNC de vertebrados (Cotman et al, 1987).

LA EPILEPSIA Y SUS CAUSAS

La Organización Mundial de la Salud ha definido a la epilepsia como una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes y autolimitadas que se deben a una descarga neuronal excesiva (crisis epilépticas) y que se asocian con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas. Las crisis, característica principal de la epilepsia, se producen por alteraciones patológicas en las propiedades de las neuronas y en las interacciones sinápticas entre ellas, también pueden ocurrir después de la administración de sustancias químicas o toxinas que producen alteraciones agudas reversibles de la función cerebral o por el desarrollo de alteraciones estructurales permanentes debidas a trauma, enfermedad o anomalía genética (MacDonald, 1991).

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS CRISIS EPILEPTICAS

Las manifestaciones de una crisis pueden depender en parte de la edad y estado conductual del sujeto (privación de sueño, alerta, actividad) y la localización cerebral donde ocurre la anomalía eléctrica. Una descarga en el área motora puede inducir el movimiento involuntario de un miembro o de la cara, la actividad convulsivante en las regiones somato-sensoriales causa sensaciones de hormigueo y entumecimiento; las descargas occipital o parietal posterior generan fenómenos visuales líneas serradas, puntos luminosos y de colores. El tipo más común de crisis en humanos adultos se origina en las estructuras límbicas o lóbulos temporales (Gloor et al, 1982), éstas crisis son generalmente precedidas por auras, malestar visceral, deja vu, jamai vu, vértigo. Una clasificación definitiva de las crisis se hará,

al parecer, cuando se entienda mejor su patofisiología, sin embargo se han hecho intentos para clasificarlas (Dreifuss, 1981). Para el clínico, la importancia está en tener una correlación con la patología subyacente, el pronóstico y con la responsividad a un medicamento particular o terapia quirúrgica. Para el investigador, la clasificación sirve como un recordatorio, no para inferir conclusiones excesivamente generales acerca de los múltiples tipos clínicos de epilepsia a partir de modelos animales limitados (Fisher, 1991b).

Las crisis se clasifican dependiendo de su sitio de inicio en: **parcial (focal)** o **generalizada**. Las parciales se dividen en **simples** -sin pérdida de la conciencia- y **complejas** con pérdida o entorpecimiento de la conciencia. A su vez las **generalizadas** se dividen en **ausencias (pequeño mal)** que pueden presentarse con una breve fijación al vacío o con breves automatismos más actividades motoras como **sacudidas de párpados; tónico-clónicas (gran mal)** con caídas, rigidez y sacudidas, acompañadas con pérdida de conciencia y a veces con incontinencia urinaria. Existiendo además otros subtipos de crisis generalizadas, **mioclónicas, tónicas, clónicas, atónicas** y sin clasificar (Fisher, 1991b).

EPILEPSIA Y ELECTROENCEFALOGRAFÍA

Para lograr un diagnóstico efectivo de epilepsia y a qué tipo corresponde es necesario contar con una historia clínica cuidadosamente elaborada así como un registro electroencefalográfico (EEG), este último es un registro de la variación en el tiempo de las diferencias del potencial eléctrico (voltaje) entre dos puntos a nivel del cuero cabelludo. La investigación básica ha mostrado que los voltajes del

EEG resultan de la suma de la actividad eléctrica sincronizada de varios grupos neuronales que se encuentran debajo del área de registro del electrodo (Creutzfeldt y Houchin, 1974). A nivel celular se han hecho registros con modelos experimentales "in vitro", con la adición de sustancias convulsivantes se provocan disparos de potenciales de acción en grupo y postdescargas. Los registros intracelulares muestran que estos disparos son generados por cambios despolarizantes paroxísticos (CDP), grandes, prolongados y de tipo "todo o nada" en los potenciales de membrana los cuales están asociados con un incremento significativo en la conductancia. Se caracterizan por una despolarización repentina de la membrana de 20-50 mV, con una duración de 100 msec o más, iniciados por una despolarización lenta de la membrana (Connors y Gutnick, 1984; Johnston y Brown, 1984; Sperlin, 1988), seguido de la inhibición (ver fig. 1). Se han reconocido varios patrones característicos en el EEG de diferentes tipos de epilepsia, p.ej. durante una crisis de ausencia en el EEG aparecen complejos punta-onda rítmicos con una frecuencia de 3-4 ciclos por segundo (cps); durante una crisis tónico-clónica hay una desincronización seguida de la aparición de una actividad sostenida de 15-25 cps que se continúa con la aparición de poliespigas, espigas aisladas y después de la crisis se presenta un aplanamiento de la actividad del EEG. Al periodo en que se presenta la crisis se le conoce como "ictal", mientras que al intervalo entre una crisis y otra se le denomina "interictal", durante este, el EEG puede ser normal aunque se pueden presentar descargas que no afecten la conducta normal; estas descargas pueden ser útiles para la localización de un foco epiléptico.

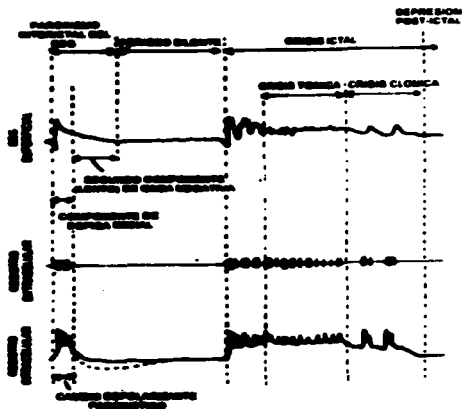


Fig. 1 En esta figura se muestra el registro de la actividad convulsiva con tres diferentes metodologías, como el registro del EEG superficial por medio de electrodos colocados en la superficie del cuero cabelludo; la actividad multiunitaria y unitaria obtenida con el registro extra e intracelular respectivamente con microelectrodos o micropipetas de vidrio, con éstas dos últimas metodologías podemos registrar los cambios locales de un grupo reducido o una sola neurona al aplicar un estímulo eléctrico o químico capaz de provocar una crisis epiléptica. También se puede observar que en el periodo ictal (cuando se presenta la crisis), existe una correlación entre la actividad registrada a nivel superficial con la que se produce a nivel celular; cada que se presenta una espiga punta onda en el EEG superficial, también se presentan grupos de disparos neuronales a nivel extra e intracelular (Ayala et al, 1973)

MODELOS ANIMALES DE EPILEPSIA

Hasta la fecha, las consideraciones éticas para experimentar en el cerebro de pacientes epilépticos humanos han sido la principal restricción que ha dificultado el conocimiento de los mecanismos intrínsecos del origen y difusión de las crisis epilépticas en todo el cerebro. Dada la limitante anterior ha sido necesario el empleo de modelos experimentales que simulan algunas de las características clínicas y conductuales que se presentan normalmente en la patología epiléptica de humanos (Engel, 1991). Los modelos experimentales de epilepsia son necesarios para: 1) estudiar la patofisiología de las epilepsias o crisis epilépticas, 2) estudiar los mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos utilizados en la clínica, 3) para estudiar las alteraciones en la eficacia de los fármacos durante el tratamiento crónico, 4) estudiar los mecanismos de resistencia de las crisis a los fármacos y 5) para la búsqueda de nuevos fármacos antiepilépticos (Löscher, 1993). Con el uso de estos modelos se pueden estudiar algunos de los mecanismos básicos de las crisis. La adecuada elección del modelo requiere la consideración de varios factores como son: la naturaleza e identificación de los sistemas neuronales que producen epilepsia, por qué y cómo se inician y difunden las crisis, qué tipos de patologías dan origen a las crisis, si estas causan daño al cerebro y el mecanismo de acción de los anticonvulsivantes. Con base en estos factores y a las variables a estudiar se debe elegir correctamente el tipo de crisis que se requiere inducir y la utilidad del modelo para contestar cualquiera de esas preguntas (Fisher, 1989; 1991a).

Son pocas las especies animales que presentan crisis en forma espontánea (perros, ratas, ratones, hámsters), sin embargo, estos no se utilizan frecuentemente en la prueba de fármacos anticonvulsivantes dado que son pocos los laboratorios en donde se pueden adquirir dichas especies ya

que son cepas escrupulosamente cuidadas y seleccionadas, además de que las crisis no se pueden inducir en cualquier tiempo, su frecuencia es baja y no se han demostrado de manera convincente las similitudes patofisiológicas entre estos modelos y la condición epiléptica en humanos (Engel, 1992).

Los modelos experimentales de crisis están basados en la aplicación de sustancias químicas (penicilina, ácido kainico, bicuculina, pentilentetrazol (PTZ), pilocarpina, etc.), estímulos eléctricos (electrochoque, kindling) y sensoriales (fotoestímulos, ruido, etc.) directamente al tejido cerebral, por vía sistémica y estimulación sensorial (Tabla 1). Todos estos tipos de estimulación dan origen a manifestaciones conductuales y electrofisiológicas que simulan a las crisis epilépticas que se observan en humanos (Fisher, 1989; 1991a; De Deyn et al, 1992).

Se han propuesto y se utilizan en todo el mundo principalmente dos modelos de crisis convulsivas para probar la eficacia de los fármacos con propiedades antiepilépticas de reciente síntesis y de uso común en el mercado: Las pruebas con crisis por electrochoque máximo (ECH) y por administración sistémica de PTZ aplicadas principalmente a roedores (Löscher y Smith, 1988; Löscher, et al., 1991; De Deyn et al, 1992; Fisher, 1989; 1991a); el tipo y severidad de las crisis obtenidas en estos modelos están relacionadas con la intensidad de la corriente del estímulo del ECH y la dosis y ruta de administración del PTZ.

TABLA I

MODELOS ANIMALES DE CRISIS EPILEPTICAS

Parcial simple, aguda

- Convulsivantes tópicos: Penicilina, Bicuculina, Picrotoxina, etc.
- Estimulación eléctrica aguda.
- Síndrome de abstinencia al GABA.
- Rebanadas de corteza cerebral.

Parcial simple, crónica

- Metales en corteza: Cobalto, Tungsteno, Hidróxido de Aluminio, Zinc, etc.
- Daño por congelamiento.
- Inyecciones de gangliósidos.
- Epileptogénesis focal sistémica.

Tónico-clónica generalizada.

- Genética: mandriles fotosensibles, crisis audiogénicas en ratón, ratas, perros epilépticos.
- Electrochoque.
- Convulsivantes químicos: PTZ, Penicilina, Bicuculina, Picrotoxina, etc.

- Trastornos metabólicos: Hipoxia, hipoglicemia, uremia, altas temperaturas, abstinencia a drogas.

Parcial compleja

- Acido Kainico.
- Inyección en área tempestas.
- Kindling.

Ausencias generalizadas

- Estimulación talámica.
- Focos corticales bilaterales.

Estatus epiléptico

- Litio-Pilocarpina.
- Cobalto- Homocisteína.

* Tomado de Fisher,
1989.

PENTILENTETRAZOL

El 6,7,8,9-tetrahidro-5H-tetrazol[1,5-a]azepina (PTZ), también llamado Cardiazol o Metrazol, es un derivado del tetrazol con acción convulsivante utilizado desde la década de 1940 (Richards y Everest, 1944). Estos autores encontraron que la trimetadiona era capaz de prevenir las crisis inducidas por PTZ en roedores. Inicialmente este modelo se utilizó como una prueba para fármacos con propiedades anticonvulsivantes que son específicamente útiles contra las crisis de ausencias en ratones, gatos y primates, ya que la etosuximida, efectiva en el tratamiento de las crisis de ausencia en humanos, previene las crisis provocadas por PTZ pero no las provocadas por ECH; la Difenilhidantoína generalmente empleada en el tratamiento de crisis generalizadas tónico-clónicas en humanos, previene las crisis por ECH pero no las de PTZ en animales, por lo que los fármacos que previenen las crisis de PTZ son potencialmente útiles para el tratamiento de las crisis de ausencias en humanos (Löscher y Smith, 1988; Löscher et al, 1991; Fisher, 1989; 1991a; De Deyn et al. 1992).

A nivel molecular se ha reportado que el PTZ se une al sitio de picrotoxina del complejo receptor GABA_A /Benzodiazepina (Ramanjaneyulu y Ticku, 1984). Concentraciones milimolares de PTZ producen despolarizaciones paroxísticas (Speckman y Caspers, 1973; Fowler y Partridge, 1984) y alteran la conductancia del ión cloruro (Prichard, 1971; Fellmar y Wilson, 1977) en neuronas de invertebrados. De Deyn y McDonald en 1989, encontraron que se inhibe la conductancia del ión cloruro en cultivo de neuronas de médula espinal de ratón. También el PTZ se ha utilizado como modelo de kindling químico (Pinel y Cheung, 1977; Grecksch et al, 1990; Córdá et al, 1992; Schünzel et al, 1992).

El PTZ se puede administrar por vía intravenosa (i.v), subcutánea (s.c) e intraperitoneal (i.p) a dosis que van desde 50-100 mg/kg. en ratones o ratas. Sus efectos se pueden observar a los 30 minutos posteriores a su administración, su tiempo de vida media es de aproximadamente 3.8 horas

mantiéndose constante la concentración intracerebral hasta 2 horas después de la primer crisis, 24 horas después de su administración las concentraciones cerebrales han disminuido en forma significativa y son tan pequeñas que los cambios que se producen no se asocian a la actividad del PTZ (Halonen et al, 1992). La dosis convulsivante 97 (DC₉₇) del PTZ, es decir la dosis a la que convulsionan el 97% de los animales es de 85 mg/kg. en ratones y de 70 mg/kg. en ratas administrado por vía i.p. o s.c. Conductualmente el PTZ induce por orden de aparición: a) sacudidas mioclónicas, b) mioclonias de miembros anteriores y posteriores y c) crisis generalizadas tónico-clónicas con pérdida del equilibrio. En el EEG durante las crisis se observan espigas punta-onda y poliespigas (Fisher, 1991a; Löscher et al, 1991; De Deyn et al, 1992). El origen de esta actividad no se conoce con certeza pero se ha propuesto que se inicie en sitios subcorticales (Velasco et al, 1975; Miraki y Ferrendelli, 1986; 1987). También se ha demostrado que los niveles de GLU, ASP, Glicina y Taurina en el sistema nervioso central (SNC) aumentan a consecuencia de las crisis generalizadas provocadas por PTZ (Halonen et al, 1992).

FÁRMACOS ANTEPILEPTICOS

Hasta la fecha no se ha encontrado ningún fármaco capaz de prevenir la aparición de las crisis epilépticas, y los ya existentes en el mercado más frecuentemente empleados en la terapia anticonvulsiva tienen la capacidad de controlar pero no de prevenir la aparición de las crisis (Eadie y Tyrer, 1989). El primer compuesto químico utilizado para controlar la epilepsia fue el bromuro de potasio, que actualmente se utiliza en el tratamiento de pacientes con porfiria, el fármaco es relativamente tóxico ya que causa dermatitis y psicosis en algunos pacientes. En 1912 se introdujeron los barbitúricos (fenobarbital y sus derivados), que demostraron ser más efectivos y presentar menor toxicidad y actualmente siguen usándose. En 1938 se introdujo la difenilhidantoína, un compuesto químicamente similar a los barbitúricos pero que produce un efecto sedante menor. En los años posteriores se introdujeron al mercado fármacos como la etosuximida, carbamazepina, valproato, las benzodiazepinas y más recientemente la vigabatrina, lamotrigina y la oxcarbamazepina (Gross, 1992; Porter y Rogawski, 1992; Meldrum, 1992). La búsqueda de nuevos fármacos antiepilépticos se ha basado en la capacidad de éstos para: a) la facilitación de la actividad inhibitoria, b) el bloqueo de la excitación sináptica y c) la modulación de los canales iónicos que son los mediadores fundamentales de la excitabilidad neuronal. Actualmente las investigaciones se han enfocado sobre el potencial terapéutico del bloqueo de la actividad de los aminoácidos excitadores (AAE), en especial del glutamato (GLU) (Porter y Rogawski, 1992; Rogawski, 1992).

AMINOÁCIDOS EXCITADORES Y EPILEPSIA

La neurotransmisión mediada por los aminoácidos excitadores (AAE) juega un papel importante en diferentes procesos tanto fisiológicos como patológicos, es un componente de la potenciación a largo plazo y la formación de la memoria (Collingridge y Bliss, 1987), también se ha demostrado que el GLU y el aspartato (ASP) están involucrados en el proceso epiléptico ya que en rebanadas de tejido epiléptico extraído de pacientes humanos las concentraciones de GLU y ASP están elevadas (Sherwin et al, 1988), también en pacientes a los cuales se les sometió a cirugía de epilepsia utilizando una microdialisis intracerebral en combinación con un registro electroencefalográfico se encontraron niveles elevados de GLU, ASP y glicina asociados con el inicio de la actividad convulsiva focal (Ronneengstrom et al, 1992). La estimulación prolongada o excesiva de una vía excitadora produce procesos degenerativos y muerte celular, además esta estimulación involucra la liberación de otros neurotransmisores (Meldrum y Garthwaite, 1990; Meldrum, 1993; Farooqui y Horrocks, 1991; Ruzicka y Jhamandas, 1993).

EL GLUTAMATO Y EL ASPARTATO EN EL SNC

El ácido glutámico o glutamato (GLU), de 5 carbonos y el ácido aspártico o aspartato (ASP), con 4 carbonos (fig. 2) son aminoácidos dicarboxílicos no esenciales que cumplen los criterios para ser considerados neurotransmisores (Cotman e Iversen, 1987), son sintetizados a partir de la glucosa y otros precursores en el ciclo de Krebs (fig. 3) y a partir de la glutamina por la enzima glutaminasa (McGeer y McGeer, 1989), en estudios realizados en rebanadas cerebrales se ha encontrado que el GLU se deriva principalmente de la glutamina (Browning, 1992). El GLU es el componente principal de la

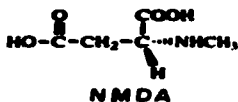
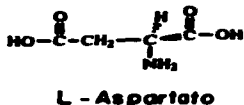
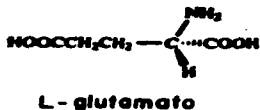


Fig. 2 Aquí se muestran las fórmulas químicas del L-GLU y del L-ASP, que se encuentran involucrados en la neurotransmisión excitatoria de los vertebrados. El ácido N-Metil_D-aspártico (NMDA) se deriva del L-ASP por la metilación de su grupo amino, lo que le dá una mayor afinidad por su receptor que es el L-GLU.

síntesis de proteínas y péptidos como el glutatión (Fonnum, 1984), funciona como un fijador del grupo amino para desintoxicar al cerebro de amonio y es un precursor inmediato del GABA para su síntesis. Además de las neuronas, también las células gliales pueden acumular GLU por un proceso dependiente de sodio, y convertirlo en glutamina por medio de la enzima glutamín-sintetasa. Así, la glutamina puede ser liberada al espacio extracelular y ser capturada por las terminales glutamatérgicas, donde es convertida a GLU por la glutaminasa (Browning, 1992). El GLU se almacena y se transporta en las vesículas sinápticas (Maycox et al, 1990) y es liberado en forma Ca-dependiente (Nicholls, 1989) hacia el espacio extracelular.

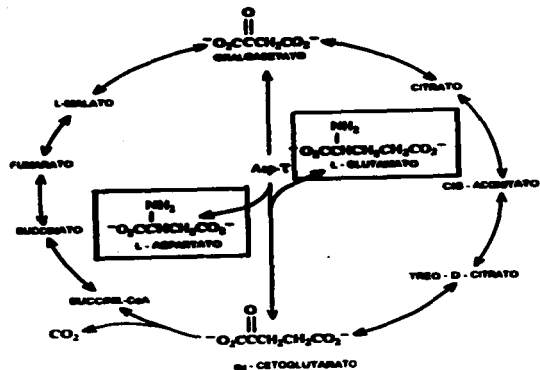


Fig. 3 En esta figura se muestra el ciclo de Krebs, a partir del cual se forma el L-GLU y el L-ASP. El L-GLU, neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos, se forma principalmente a partir del α -cetoglutarato por la acción de la deshidrogenasa del ácido Glutámico.

SUBTIPOS DEL RECEPTOR DE GLU

A principios de la década de 1950, se reportó que la aplicación local de GLU inducía disparos en las neuronas corticales de la rata (Hayashi, 1952). Posteriormente, al inyectar GLU y ASP en la médula espinal de gatos se reportó que el GLU es más potente que el ASP en algunos sitios y viceversa por lo que se postuló que hay receptores GLU-preferentes así como receptores ASP-preferentes (Curtis y Watkins, 1960; McLennan, 1982) es a partir de estos hallazgos que se han sintetizado y estudiado ligandos específicos para los diferentes subtipos de receptores al GLU (Curtis y Watkins, 1960). Hasta la fecha se han reportado 5 subtipos de receptores de GLU, que se han clasificado como ionotrópicos (acoplados a un canal iónico) o metabotrópicos (acoplados a la formación de segundos mensajeros). Los ionotrópicos a su vez se han categorizado en los siguientes 4 subtipos, basados en los ligandos con que interactúan preferencialmente, su activación provoca la apertura de un grupo de canales iónicos que se tipifican por sus diferentes permeabilidades al Na^+ , K^+ y Ca^{++} .

- a) N-Metil-D-Aspartato (NMDA)
- b) Kainato (KA)
- c) α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol (AMPA)
- d) L-AP4
- e) Metabotrópico

El 5o subtipo, el receptor metabotrópico, actúa a través de un mecanismo dependiente de proteínas G, cuya activación lleva a un incremento en los niveles intracelulares de 1,4,5-trifosfato de inositol y diacilglicerol con la movilización de Ca^{++} desde las pozas intracelulares.

EL RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA)

Los receptores NMDA están distribuidos en todo el SNC y participan en la neurotransmisión de la mayoría, sino es que en todas las sinápsis excitatorias del cerebro y la médula espinal (Rogawski, 1992), se ha observado que su mayor concentración se encuentra en el hipocampo y la corteza cerebral (Cotman et al, 1987; Monaghan y Cotman, 1989). El receptor NMDA es una proteína integral de la membrana que ha sido clonada y caracterizada, consiste de por lo menos cinco subunidades de diferente peso molecular (Moriyoshi et al, 1991; Nakanishi, 1992), tienen un poro catión-selectivo que sirve como vía para el paso de iones. Tienen 5 propiedades importantes: 1) el canal es bloqueado en una forma dependiente de voltaje por magnesio (Mg^{++}); 2) permiten el paso del Ca^{++} , Na^{+} y K^{+} ; 3) adopta múltiples estados de conductancia; 4) la exposición continua a los agonistas de NMDA produce disminución a corto y largo plazo en la sensibilidad del sistema a NMDA y 5) la glicina potencia la respuesta a NMDA (Ascher y Nowak, 1987; Ascher y Johnson, 1989). También tiene por lo menos cinco sitios que modulan su actividad (Fagg y Massieu, 1991); el primero es el de reconocimiento del transmisor al cual se unen varios agonistas como el GLU y el mismo NMDA, así como algunos antagonistas. El segundo es ocupado por la glicina insensible a la estricnina ya que al administrar dosis submicromolares de glicina se incrementa la frecuencia de apertura de canales inducida por NMDA (Johnson y Ascher, 1987). El tercero es el sitio de unión al canal de fenciclidina (PCP), estudios con radioligandos muestran que la PCP y sustancias relacionadas (Ketamina, MK-801) no ejercen su acción directamente sobre el sitio de reconocimiento del transmisor, más bien sobre el canal iónico asociado al receptor. El cuarto es el sitio modulador de poliaminas (espermina y espermidina) las cuales potencian la actividad convulsivante del NMDA. Y el último sitio es el de unión al Zinc que reduce la frecuencia de apertura del canal asociado (fig. 4).

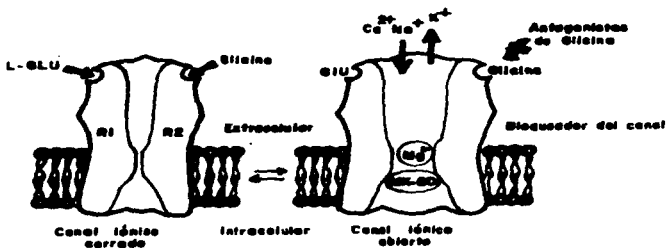


Fig. 4 El receptor NMDA, que se encuentra muy involucrado en los procesos que dan como resultado la epilepsia, ha sido estudiado principalmente por la síntesis de antagonistas específicos que bloquean su actividad y está formado por al menos dos subunidades proteínicas (R1 y R2). Tiene varios sitios de reconocimiento del ligando: el L-GLU y sus agonistas relacionados se unen y promueven la apertura de un canal de alta conductancia que permite la entrada de Ca^{++} y Na^{++} en las células blanco. La Glicina potencia los efectos del GLU y sus agonistas. En condiciones normales el Mg^{++} bloquea la actividad del GLU. Los antagonistas competitivos (AP-5, AP-7, CPP) actúan sobre el sitio de unión del GLU y los no-competitivos (Ketamina, PCP, MK-801) actúan ocupando un sitio dentro del canal iónico.

El receptor a NMDA es activado por AAE, los agonistas requieren de dos grupos ácidos, separados por uno (ASP) o dos (GLU) grupos metilo y un grupo amino en el mismo carbono de un grupo carboxilo (Mayer, 1991), induciendo una entrada de iones Ca^{++} y Na^{+} al interior de la célula y una salida de K^{+} desde el citoplasma hacia el espacio extracelular, provocando un potencial sináptico despolarizante ya que en la membrana, durante el potencial de reposo, el Mg^{++} se encuentra bloqueando el canal del receptor a NMDA (Headley y Grillner, 1990). Se sabe que el NMDA administrado por cualquier vía es capaz de producir despolarizaciones y crisis (Mathis y Hungerer, 1992; Mares y Velisek, 1992; De Deyn et al, 1992) y que está involucrado en el mecanismo de la epileptogénesis (Avoli, 1991; Heinemann et al, 1991; De Deyn et al, 1992; Dichter, 1994; McNamara, 1992; Löscher, 1993; Rogawski, 1992). La participación del receptor a NMDA en las crisis se ha reconocido por: a) Los antagonistas de NMDA detienen las crisis inducidas con varios fármacos convulsivantes, kindling y la actividad epileptiforme de tejido cerebral extraído de focos epilépticos de humanos (Avoli, 1991); b) Tiene un papel clave en varios procesos "plásticos" como el kindling y c) La activación de los receptores de NMDA resulta en procesos neurodegenerativos con una histopatología similar a la observada en animales y pacientes con crisis epilépticas (Lehmann et al, 1991). El receptor a NMDA ha sido el más ampliamente estudiado ya que se han sintetizado antagonistas potentes y específicos que modulan su actividad, además bloquean el desarrollo de las crisis provocadas experimentalmente (Fisher, 1991c; Porter y Rogawski, 1992).

ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR A NMDA Y EPILEPSIA

Los antagonistas del receptor a NMDA son aminoácidos análogos estructuralmente del GLU y el ASP, en los cuales el grupo amino de la cadena lateral de carbono del aminoácido es sustituido por un grupo "fosfono". esta cadena de carbono puede ser lineal con un grupo amino (NH₂) en el carbono 2 y un carboxilo (COOH) terminal o bien pueden estar unidos grupos cíclicos de piperazina (Watkins, 1989; Chapman, 1991) y se dividen en competitivos y no-competitivos.

ANTAGONISTAS COMPETITIVOS

El término "competitivo" se aplica a la capacidad que tienen los antagonistas de desplazar al GLU de su sitio en el receptor, esto se ha observado en estudios de binding (unión o ligamiento) en rebanadas de tejido cerebral (Olverman y Watkins, 1989; Mayer, 1991). A este grupo pertenecen: el 2-amino-5-fosfonopentanoato (AP-5), el 2-amino-7-fosfonoheptanoato (AP-7) y el ácido 3-((+)-2-carboxipiperazina-4-il)-propil-1-fosfónico (CPP), se ha informado que estos reducen y previenen las crisis convulsivas inducidas en varios modelos experimentales (fig. 5). El AP-5 y el AP-7 aplicados intracerebroventricularmente (i.c.v.) previenen las crisis provocadas por PTZ y con estimulación auditiva en ratones (Croucher et al, 1982), este fue el primer trabajo donde se reportó que los antagonistas competitivos del receptor NMDA tienen propiedades antiepilépticas, se demostró que los antagonistas competitivos tienen una baja penetración a través de la barrera hematoencefálica y tienen una mayor potencia aplicados intracerebralmente. La aplicación bilateral de 0.02, 0.06 y 0.1 μ moles de AP-7

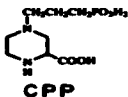
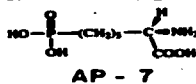
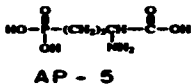


Fig. 5 En esta figura se muestran las estructuras químicas de los antagonistas competitivos del receptor NMDA de cadena abierta como el AP-5 y el AP-7 o con cadena cerrada como el CPP, todos estos compuestos son altamente selectivos para el receptor NMDA y han mostrado tener propiedades anticonvulsivas al administrarse por cualquier vía en diferentes modelos experimentales de crisis epilépticas.

intranigral suprime el componente tónico de las crisis producidas por ECH en forma dosis-dependiente (De Sarro et al, 1985), al inyectar 100 pmol de AP-7 unilateral en la corteza prepiriforme profunda, se reduce la actividad epiléptica provocada por la microinyección de bicuculina, carbacol y ácido kainico en el mismo sitio (Piredda y Gale, 1986); en el modelo de kindling se encontró que con la administración i.c.v de 42 µg AP-5, se retarda la aparición de las crisis generalizadas (Cain, 1989) y que aplicado en la Sustancia Inominata de ratas con kindling previamente, previno la crisis conductual pero no redujo la postdescarga y en la amígdala kindleada aumentó el umbral para producir la postdescarga (Mori y Wada, 1989). En ratas susceptibles genéticamente a crisis provocadas por estimulación auditiva, se encontró que con la microinyección bilateral de 0.1 y 1.0 nMol de AP-7 y 0.1 y 1.0 nMol de CPP en el colículo inferior se suprimieron las crisis y en la FRP se inyectó también en forma bilateral el AP-7 sólo que a una dosis mayor 12.5 nMol bloqueándose las crisis (Faingold et al, 1992). En otro trabajo se reportó que la administración sistémica de AP-7 (175 mg/kg. i.p) que tuvo efectos anticonvulsivantes, provocó una reducción significativa del disparo de las neuronas del colículo inferior sugiriendo que los antagonistas competitivos del receptor NMDA juegan un papel importante en esta estructura respecto a la regulación de las crisis (Faingold et al, 1993).

ANTAGONISTAS NO-COMPETTIVOS

El término antagonista no-competitivo se usa para definir la acción de un fármaco que previene el efecto de un agonista, actuando en un sitio diferente al de este, en este caso los antagonistas no-competitivos actúan sobre el canal iónico asociado al receptor NMDA (Kemp et al, 1987). Se han encontrado por lo menos tres diferentes clases de antagonistas no-competitivos de NMDA: el Mg^{++} ,

que bloquea en forma voltaje-dependiente el canal asociado al receptor NMDA (Aacher y Nowak, 1987; Lodge et al, 1989), el Zn^{++} que bloquea las corrientes inducidas por NMDA en forma independiente del voltaje (Lodge y Johnson, 1990); por último, aquellos que se unen al sitio denominado "receptor de fenciclidina" o receptor PCP, ejemplos de estos son, los anestésicos disociativos como la PCP, la ketamina, el MK-801 y los derivados de la morfina, como el dextrorfan (Trube, 1994; Zhang, 1994) y el dextrometorfán (Kemp et al, 1987; Fisher, 1991b; Chapman, 1991; Trube, 1994). (fig. 6).

El MK-801

La (5R, 10S)-(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cicloheptén-5,10-imina, también conocida como dizocilpina o MK-801 tiene un P.M= 337.37 y una fórmula molecular de $C_{16}H_{15}N-C_4H_4O_4$, es uno de los primeros antagonistas no-competitivos del receptor NMDA descritos que se podían usar "in vivo", en diferentes modelos de epilepsia ha demostrado ser un antiepiléptico eficaz. Administrado en forma intraperitoneal (i.p), previene el kindling con PTZ (Corda et al, 1992), y con estimulación eléctrica lo retarda pero no suprime las postdescargas (Mintz et al, 1990; Morimoto et al, 1991). En un estudio ontogenético se demostró que suprime de manera dosis-dependiente las crisis generalizadas con PTZ en ratas (Vellek et al, 1991) y en otro estudio administrando MK-801 i.p. a ratas prepubescentes 30 minutos antes de administrar el AK 10 mg/Kg. se observó que las crisis se redujeron y además disminuyó la susceptibilidad a las crisis provocadas por Fluorotil, un convulsivante volátil (Stafstrom et al, 1993). Administrado 5 mg/kg. i.p a cobayos, previa o posteriormente al daño provocado por el status epiléptico con soman (agonista colinérgico) previno la aparición de crisis y daño cerebral (Sparenborg et al, 1992). En otro trabajo se mostró que el MK-801, la Ketamina y la PCP previenen en forma dosis-dependiente las crisis conductuales y el daño

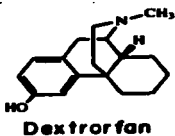
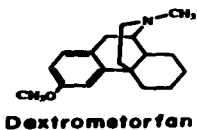
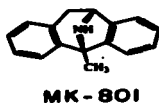
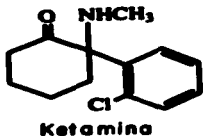


Fig. 6 Ejemplos de algunos de los antagonistas no-competitivos del receptor NMDA, siendo el más potente hasta la fecha el MK-801, el bloqueo de la activación del receptor NMDA se da porque los antagonistas se sitúan dentro del canal iónico impidiendo la entrada de Ca⁺⁺ y Na⁺. El MK-801 además de prevenir o reducir las crisis experimentales también posee efectos neuroprotectores como se ha demostrado en modelos experimentales de isquemia y daño cerebral vascular.

de ciertas estructuras cerebrales provocado por la administración de AK 12 mg/kg. en ratas (Clifford et al, 1990). Se encontró que la administración conjunta de MK-801 con diazepam, protegieron contra el daño por status epiléptico provocado con litio y pilocarpina, a partir de estos últimos datos se ha propuesto que el MK-801 puede ser un agente útil para el tratamiento del status epiléptico refractario en humanos por su acción neuroprotectora y su habilidad de potenciar las drogas GABAérgicas (Walton y Treiman, 1991). Otros investigadores encontraron que con la microinyección bilateral de 40 nMol de MK-801 en el colículo inferior y de 1.6-20.0 nMol también bilateral en la FRP las crisis auditivas en ratas susceptibles genéticamente a ruido se suprimieron o se redujeron respectivamente, en este trabajo se enfatiza que los antagonistas de tipo competitivo son más potentes anticonvulsivantes que los de tipo no-competitivo (Faingold et al, 1992).

FORMACIÓN RETICULAR Y EPILEPSIA

A principios del siglo XIX, Hughlings Jackson reconoció el papel de la corteza cerebral en la iniciación, difusión y expresión de muchos tipos de crisis. Estas observaciones se confirmaron con los trabajos de Ferrier 1873 en los cuales reporta la aparición de actividad convulsiva con la estimulación eléctrica de la corteza en animales. A mediados del siglo XX, Penfield y Jasper (1946, 1954) propusieron que las crisis generalizadas se originaban en el cerebro medio y el tallo cerebral (TC) superior, responsables de la integración de la función de los hemisferios cerebrales "Sistema integrador centroencefálico", a esta proposición se le llamó la "Teoría Centroencefálica" (Fromm, 1987; Miller y Ferrendelli, 1988). Los estudios electrofisiológicos han sido útiles para apoyar el papel que juega la Formación Reticular (FR) en la iniciación de las crisis generalizadas inducidas en diferentes modelos

experimentales que hacen que se aumente la sensibilidad y la responsividad de las neuronas de la FR a estímulos sensoriales, este efecto puede ser revertido por diversos anticonvulsivantes (Faingold y Riaz, 1992). Variando la dosis de convulsivantes químicos inyectados sistémicamente o las intensidades de la corriente, se producen signos de actividad convulsiva que van desde faciales (mioclonias de mandíbulas, movimiento de vibrinas y orejas, cabeceo) y mioclonias de miembros anteriores con dosis mínimas de estimulación, hasta la extensión tónica de miembros anteriores y posteriores al aplicar dosis máximas. De estas observaciones han surgido modelos de crisis mioclónicas y los de crisis tónicas, proponiendo que las estructuras del cerebro anterior están involucradas con la expresión y generación de la actividad clónica (especialmente las mioclonias faciales y de miembros anteriores), proponiendo al área tempestas que se localiza en la corteza prepiriforme y a la sustancia nigra como núcleos importantes en la generación y propagación de este tipo de crisis (Gale y Browning, 1988; Gale, 1989) y que el sistema del TC está involucrado con las convulsiones tónicas así como con las mioclonias de carrera-dolor (explosivas) vistas en roedores. Los sustratos anatómicos dentro del TC responsables de la generación de las crisis tónicas no están bien caracterizados, pero se piensa que la FRP y la FRM son posibles candidatos ya que la estimulación de esas áreas provoca convulsiones tónicas y las lesiones de esas áreas las atenúan (Browning, 1987; Gale y Browning, 1988). Una gran cantidad de experimentos sugieren que las descargas epilépticas se propagan y generalizan a través de vías subcorticales aún cuando la actividad epiléptica se origine en la corteza cerebral, el hecho de que las lesiones de la FRM y la FRP supriman las convulsiones en los animales experimentales proporciona un argumento adicional en favor de la idea de que las estructuras subcorticales juegan un papel importante en la propagación de las convulsiones generalizadas (Fromm, 1987).

ANATOMÍA DE LA FORMACIÓN RETICULAR

El tallo cerebral (TC) es una región relativamente pequeña entre la médula espinal y el diencefalo. Regula los procesos sensoriales y motores. Está formada principalmente por tres regiones que se aprecian desde una vista ventral, estas son el cerebro medio o mesencéfalo, el puente y el bulbo, estas estructuras contienen fibras sensoriales, somáticas viscerales y motoras así como los núcleos de los nervios craneales. Embebidas entre los tractos y los núcleos del TC están las células de la Formación Reticular (FR) ordenadas en distintos grupos funcionales con base en sus conexiones y la naturaleza bioquímica de sus transmisores. La FR está compuesta de neuronas que están fuera de los grupos nucleares del TC, ésta representa la extensión rostral del centro interneuronal de la médula espinal. La característica principal de las neuronas de la FR es que distribuyen sus axones ampliamente en dirección rostral y caudal desde el TC (Role, 1991).

Anteriormente se pensaba que la FR del TC era una región relativamente homogénea, sin embargo, recientes estudios citoarquitectónicos indican que la FR está formada por varios núcleos morfológicamente distintos con conexiones eferentes heterogéneas. Las fibras ascendentes de la FR, particularmente las del TC superior, se distribuyen ampliamente hacia estructuras asociadas con el sistema oculomotor/visual, el subtálamo (campos de Forel/zona incerta) y núcleos "no específicos" del tálamo. Las fibras de la FR bulbar proyectan hacia regiones de la médula espinal como el cuerno dorsal, la columna intermediolateral y lámina 9; estas proyecciones se han relacionado con muchas funciones incluyendo la conducta locomotora, la atonía del REM, la respiración y la regulación cardiovascular (Vertes, 1990). Anatómicamente la FR se define como un grupo indiferenciado de células localizadas en el centro del TC. Empleando la tinción de Nissl, las secciones del TC dan la

Impresión de un grupo de células en forma de red que no se pueden dividir fácilmente en núcleos separados. Actualmente se le está tratando de diferenciar por grupos con base en su morfología, conexiones y neurotransmisores. Es posible ver también la anatomía de la FR desde el punto de vista filogenético se ha postulado que vías neuronales bien definidas están dispersas en todo el TC de vertebrados inferiores. Así en su evolución, el TC debió haber tenido una apariencia de retículo, con entradas difusas de fibras y algunos grupos celulares separados por distintos grupos de fibras.

La FR se divide en 3 zonas: a) una región pequeña en la línea media formada principalmente por los núcleos de Rafe, b) un campo tegmental medial grande (CTM), muchos consideran a los grupos de núcleos anteriores como regiones efectoras ya que muchas de las fibras largas ascendentes y descendentes se originan principalmente aquí, y c) un campo tegmental lateral grande (CTL). Este último se considera un campo sensorial o receptivo debido a que recibe muchas proyecciones sensoriales secundarias, además tiene numerosas proyecciones ipsilaterales hacia los núcleos craneales motores por lo que también se considera una región motora. Al CTL se le conoce también como la FR "parvocelular" porque está formado por muchas células pequeñas que rodean a los núcleos craneales V y VII. El CTM es considerado más "magnocelular" por la presencia de grandes células en el bulbo ventromedial (núcleo reticularis gigantocellularis). Los núcleos de Rafe se encuentran en forma continua desde la parte caudal del bulbo hasta la parte rostral del cerebro medio. El bulbo y el puente caudal tienen considerables cantidades de células del CTM y del CTL predominando este último en la parte caudal del bulbo. En la parte rostral del puente y en el cerebro medio, el CTL se hace más pequeño y predomina el CTM. Estos campos no se reconocen fácilmente en el diencefalo rostral ni en las porciones caudales y espinales de la FR (Van der Kooy, 1987).

PROYECCIONES HACIA LOS NÚCLEOS CRANEALES MOTORES

La porción lateral del CTL envía proyecciones cortas ipsilaterales hacia los núcleos motores bulbares. Las principales proyecciones de la región medial del CTL son bilaterales hacia los núcleos craneales motores. En contraste, el CTM tiene escasas proyecciones hacia los núcleos craneales motores, en cambio, da origen (acompañando a los núcleos de Rafe mediales) a proyecciones largas, descendentes y ascendentes, bilaterales de la FR (Holstege et al, 1977).

VÍAS DESCENDENTES DE LA FR DEL TC

Las vías descendentes de la FR hacia la zona intermedia y los núcleos motores de la médula espinal se originan en el CTM y el Rafe. En el bulbo caudal, las células con proyecciones descendentes se encuentran en los núcleos de la columna dorsal, las porciones laterales del núcleo del tracto solitario y los núcleos retroambiguos. En el bulbo rostral, uno de los grupos neuronales más numerosos que dan origen a las vías descendentes están ventrales al CTM (núcleo gigantocelularis) y en el Rafe de la línea media (Rafe magnus). En el puente, un segundo y muy numeroso grupo de neuronas con proyecciones descendentes se encuentra dorsal en la parte media del CTL, estos grupos están en áreas definidas como núcleo pontis central, locus caeruleus, subcaeruleus y núcleo de Kolliker-Fuse. En el cerebro medio el núcleo rojo también tiene proyecciones descendentes espinales, así como el colículo superior, el núcleo intersticial de Cajal, y el núcleo de Eninger Westphal. En el diencéfalo, las células que proyectan hacia la médula espinal se localizan en el hipotálamo lateral y perifornical (Kuypers, 1981). Algunos autores han dividido las vías descendentes del TC en tres grupos : A) El primero representado por el CTM, con proyecciones bilaterales y colaterales hacia la zona intermedia que a su vez proyecta hacia las

motoneuronas que inervan el tronco y los músculos de los miembros proximales. Se cree que este grupo controla el mantenimiento de la postura erecta, integra los movimientos corporales y de los miembros, coordina los movimientos de todos los miembros. B) El segundo grupo en su mayoría se origina en el núcleo rojo, a nivel mesencefálico, envía proyecciones hacia la zona intermedia medular y controla la actividad de extremidades musculares específicas distales. C) El tercero y último grupo se origina principalmente en el locus coeruleus y en el Rafe, tiene axones altamente colateralizados que inervan las motoneuronas espinales y de la zona intermedia a diferentes niveles medulares. Este grupo recibe muchas de sus entradas desde regiones límbicas del diencefalo que, al parecer, controlan el tono general de las motoneuronas. Se ha sugerido que los grupos A y C son los más importantes en lo que respecta a la búsqueda de substratos en la FR involucrados con las convulsiones, ya que de algún modo, las convulsiones motoras parecen ser el escape de la actividad de estos dos grupos de vías de control motor desde la FR.

FORMACIÓN RETICULAR PONTINA

La Formación Reticular Pontina (FRP), está compuesta principalmente por 2 núcleos, el pontis caudalis (RPC) y el pontis oralis (RPO). El RPC bordea rostralmente al núcleo gigantocelular (NGC) y se extiende aproximadamente desde la salida del nervio facial a nivel del polo rostral del núcleo motor del trigémino. El RPC se ha subdividido en una división o pars β -medial y una α -ventrolateral más pequeña, éstas células son las más grandes de la FR del TC ya que algunas miden de 100-125 μm de diámetro. El RPO, bordea rostralmente al RPC y se extiende desde el polo rostral del núcleo motor del trigémino a nivel del colículo superior. Las células gigantes del RPO, como las del RPC, están dispersas

ampliamente en todo el tegmento pontino, volviéndose un área de relativamente pocas células comparada con otras regiones reticulares. El RPO se divide en dos mitades relativamente iguales, una medial y otra lateral (Newman, 1985).

Se han encontrado y propuesto varias estructuras subcorticales como reguladoras de la actividad epiléptica provocada con diferentes modelos de crisis, sin encontrarse hasta la fecha un sustrato neuroanatómico encargado de la regulación de la actividad convulsiva (Miller y Ferrendelli, 1988). Ya se ha reportado que el cerebro anterior, las vías límbicas y la corteza prepiriforme están involucrados en la producción de ciertas formas de actividad convulsiva clónica, que en la rata están más asociadas con las mioclonías faciales y de miembros anteriores (Piredda et al, 1985; Gale y Browning, 1988). Se ha descrito que tanto la sustancia nigra (SN) como el área tempestas (AT) se encuentran involucradas en el inicio y propagación de las crisis mioclónicas empleando modelos como el kindling, bicuculina y ácido kaínico (Gale, 1989; Löscher, 1993). La lesión electrolítica o la inyección bilateral en la SN con muscimol (agonista GABAérgico) y Gama-vinil-GABA (que inhibe irreversiblemente la enzima que degrada al GABA, produciendo por lo tanto un aumento en su concentración), protegieron a los animales contra las crisis provocadas por bicuculina (Iadarola y Gale, 1982). También se reportó que el kindling incrementa la sensibilidad de los sistemas del tallo cerebral involucrados en la expresión de las crisis provocadas por Electrochoque, pero que la lesión de las estructuras del tallo cerebral no influyen en la expresión del kindling suponiendo con esto que las estructuras encargadas de la generación de las crisis mioclónicas son independientes de las que generan las crisis tónicas (Applegate et al, 1991).

Respecto a las estructuras más caudales del cerebro como la FRM y la FRP estimulando estas se pueden inducir crisis convulsivas principalmente de tipo tónico y registrando la actividad electroencefalográfica cortical durante las crisis no se muestran las espigas de alta amplitud típicas sino que se exhibe un patrón de baja amplitud asociado con el alertamiento (Burnham, 1987). Se han

reportado varios trabajos en donde se registra la respuesta de la actividad unitaria de las células de la FRM y la FRB a la estimulación eléctrica en ratas, gatos y Babuinos curarizados, con transección de la médula espinal y en libre movimiento, al aplicar un estímulo eléctrico, un número determinado de neuronas dispara grupos de potenciales postinápticos excitatorios y al aplicarles dosis subconvulsivas de fármacos convulsivantes como PTZ, Picrotoxina, Estricnina, etc. en forma sistémica se aumenta la respuesta de las neuronas de estas estructuras con la misma estimulación y al aplicar un fármaco inhibidor de las crisis como diazepam intravenoso estas respuestas son revertidas, sugiriendo que estas estructuras juegan un papel importante en la iniciación y mediación de las crisis generalizadas (Faingold y Caspari, 1987). En otra serie de trabajos con los que se ha intentado establecer los sitios de origen de la actividad epiléptica generalizada se reportó que con la aplicación intravenosa de PTZ en gatos anestesiados y curarizados, la actividad epiléptica se registra primero en la FR y posteriormente se difunde hacia la corteza cerebral (Velasco et al, 1975), las transecciones a nivel mesencefálico incrementan la duración de las crisis inducidas así como la duración de la actividad multiunitaria de la FR, (Velasco et al, 1982), también se ha observado que inyectando PTZ localmente en la FRM, ésta es más sensible que la corteza a la iniciación de las crisis (Velasco et al, 1983).

Las lesiones bilaterales de la FRP y de los pedúnculos cerebelosos atenuaron los componentes tónicos provocados por electrochoque máximo y por PTZ sin afectar las mioclonias de las crisis inducidas por PTZ o electrochoque mínimos (Browning et al, 1981). Posteriormente, las lesiones del tagmento pontino que involucran al pedúnculo cerebeloso superior y el RPO, suprimieron el componente tónico de las crisis provocadas por estimulación auditiva y por electrochoque, las sacudidas mioclónicas obtenidas con la administración de 35-50 mg/kg. de PTZ y por electrochoque mínimo no fueron afectadas por esta misma lesión de la FRP (Browning et al, 1985; Browning, 1987). En un trabajo reciente se ha reportado que la microinyección bilateral de 50 nMol de D-cicloserina

(agonista del receptor de glicina insensible a estricnina), en el RPO suprimió la extensión tónica de miembros posteriores en un 80% de los animales estudiados, sugiriendo también que la D-cicloserina actúa a través del sitio del receptor de glicina insensible a estricnina para inhibir las crisis tónicas (Peterson, 1994). También se ha reportado el papel importante que tiene el RPC en la supresión de las crisis experimentales ya que con la microinyección bilateral de AP-7 (12.5 nMol) y MK-801 a una concentración de 1.6-20.0 nMol disminuyeron la severidad de las crisis, siendo más potente el AP-7 proponiendo con estos resultados que los antagonistas del receptor NMDA de tipo competitivo y no-competitivo en estas estructuras tienen un papel importante en la regulación de las crisis audiogénicas (Faingold et al, 1992).

Los resultados del experimento realizado en este trabajo (aumento en la latencia y supresión de las crisis), muestran que los núcleos de la FRP, por medio de los receptores de tipo NMDA regulan la aparición y difusión de las crisis, además pueden ser un sitio blanco de los antagonistas del receptor NMDA de tipo no-competitivo.

O B J E T I V O S

Este trabajo tiene como objetivos:

- a) **Valorar si el AP-7, aplicado en la FRP de la rata, presenta un efecto antiepiléptico en las crisis provocadas por PTZ.**
- b) **Valorar si el MK-801 aplicado en la FRP de la rata tiene efecto antiepiléptico sobre las crisis provocadas por PTZ.**
- c) **Determinar los sitios probables en la FRP, relacionados con la regulación de las crisis epilépticas, como posibles sitios de acción de los antagonistas del receptor a NMDA.**

METODOLOGÍA

TÉCNICA DE IMPLANTACIÓN

Se utilizaron ratas macho de la cepa wistar con un peso de 250-300 g. Se anestesiaron con pentobarbital sódico (Anestestal, Norden de México) a una dosis de 65 mg/kg. Se colocaron en el aparato estereotáxico (David Kopf Inst.), introduciendo los lápices en el conducto auditivo y fijándolos al estereotáxico por medio de tornillos de tal forma que la cabeza de la rata esté centrada, lo cual permite que no haya movimientos laterales y quede completamente inmóvil, se colocaron los dientes incisivos en un sujetador. Se rasuró el pelo de la cabeza y se aplicó iodine (Ultradine espuma, Probemex) para tener limpio el campo, se practicó una incisión a lo largo del cráneo, se separó el tejido conectivo, se sujetó y separó la piel para dejar descubierto el campo. Se realizaron trépanos con fresas de acero (Meisinger, Germany) para la colocación de 2 tornillos de acero inoxidable (Small Parts Inc, cat: MX-080-2F) 1 para la introducción de una cánula guía calibre 21 de acero inoxidable (Becton Dickinson de México) dirigida estereotáxicamente hacia la FRP con las siguientes coordenadas AP: -9.8 mm a partir de bragma, L: 1.0, V: 8.5 (atlas de Paxinos, 1982), ésta queda 4.0 mm arriba de esta estructura. También se hicieron otros trépanos, dos a cada lado de la sutura parieto-frontal donde se colocaron electrodos de acero inoxidable en la corteza motora para el registro del EEG y uno del mismo material como referencia en la parte más anterior del cráneo; los electrodos se soldaron a un conector hembra de tres polos y estos junto con la cánula guía se fijaron al cráneo con acrílico dental (Orthodont, Dientes Acrílicos Mexicanos). Se les administró cloranfenicol (Clorafen, Merck-México) sobre la herida y se cerró la piel con sutura de nylon de 4 ceros (Dermalon 4-0, Cyanamid de México).

FASE EXPERIMENTAL

Posterior a la implantación, los animales se dejaron en recuperación durante una semana en cajas de acrílico transparente con alimento y agua *ad libitum*. Antes de la microinyección del fármaco se realizó un registro control del EEG normal con el animal despierto y en libre movimiento mediante un conector macho de tres polos que es la interfase entre el animal y el sistema de registro que fue un polígrafo Grass modelo 78D (Grass Instrument, Inc). Después se realizó la microinyección del AP-7 (9.0 nMol/0.2 μ l), y MK-801 (6.0 nMol/0.2 μ l) (Research Biochemicals International) y del vehículo que fue solución salina 0.9% amortiguada pH 7.4 (0.2 μ l) (Laboratorios PISA). El sistema de microinyección estuvo conformado de la siguiente manera: consistió de una aguja dental calibre 27 (Becton Dickinson) que sobresale de la punta de la cánula guía 4.0 mm, se conectó a una microjeringa Hamilton de 10 μ l (Hamilton Co.) por medio de un tubo de polietileno flexible (0.01 pulgadas de diámetro interno, 0.03 pulg. de diámetro externo) que se llena con el vehículo; se tomaron aproximadamente 5.0 μ l ya sea de AP-7, MK-801 o del vehículo y se inyectó primero una rata con salina y 10 minutos después la otra con AP-7 o MK-801, se registró la actividad electroencefalográfica durante 30 minutos observándose los cambios conductuales. Al término de este tiempo se les inyectó PTZ (Sigma Chemical Company) a una dosis de 70 mg/kg. i.p. y se registró el EEG, y la conducta epiléptica durante 90 minutos. Una vez terminada la fase experimental, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico y se les realizó una microinyección de colorante (azul de pontamina, Sigma Co.) en 0.2 μ l en el mismo sitio de inyección. Por último se les practicó una perfusión intracardiaca con solución salina y heparina (Heparina 1000, Proquigama) seguida del paso de solución de formaldehído al 10% (J.T. Baker), se extrajo el cerebro y se realizaron cortes de 120 μ m en un microtomo de congelación para la corroboración del sitio de microinyección.

Para evaluar los resultados se realizó la valoración de la latencia a la primer crisis generalizada tónico-clónica (CTCG) y los porcentajes tanto de retardo como el de supresión de las CTCG. Los datos obtenidos se analizaron con las pruebas estadísticas de ji cuadrada (χ^2), un análisis de varianza de un factor entre el grupo control y los dos experimentales con la prueba de Tukey y una t de Student

RESULTADOS

VALORACIÓN CONDUCTUAL:

En todos los animales, tanto del grupo control como los experimentales se observó si se presentaban cambios conductuales posteriores a la microinyección unilateral del vehículo, AP-7 y MK-801 en un volumen de 0.2 μ L.

En el grupo control a los que se les administró solución salina amortiguada no se presentaron cambios conductuales posteriores a la microinyección.

Los animales a los que se les aplicó AP-7 presentaron una conducta de giro ipsilateral al sitio inyectado durante los 30 minutos posteriores y con la inyección de PTZ este efecto se potenció, resultando además durante la CTCG con giro de barril.

El grupo con microinyección de MK-801 no presentó la conducta de giro observada en el de AP-7 ni la conducta de giro de barril después de la microinyección

Se presentan los resultados obtenidos con la microinyección unilateral de: control (salina) n=8; AP-7 n=8 y MK-801 n=12 en la FRP en los tres diferentes grupos de animales. Cada rata recibió solo una microinyección de cada fármaco en los tres grupos.

GRUPO I: MICROINYECCIÓN DE SALINA

A este grupo que se consideró como control se le aplicó únicamente una microinyección de 0.2 μ l de solución salina amortiguada con fosfatos, pH 7.4 en la FRP. Se observó que todos los animales presentaron CTCG con una latencia promedio de 1.9 minutos (fig. 7).

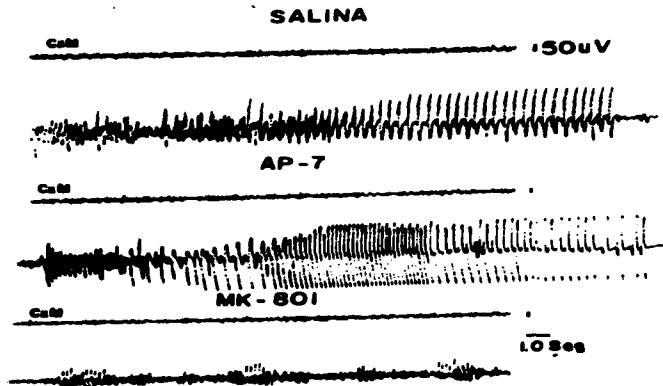


Fig. 7 En esta figura se muestran ejemplos de la actividad convulsiva registrada en la Cx motora de las ratas de los diferentes grupos a las que se les realizó una microinyección unilateral de: vehículo que fue solución salina amortiguada, AP-7 y al último MK-801 en la FRP. En la parte superior de cada manipulación (salina, AP-7, MK-801) se presenta el registro de la actividad EEGráfica normal previa a la aplicación de PTZ, y en la parte inferior, la actividad convulsivante posterior a la aplicación de PTZ (70 mg/Kg i.p.). Como se puede observar, en los grupos de salina y AP-7, posterior a la administración del PTZ se presentó actividad convulsiva de gran amplitud y duración asociada conductualmente con CTCG y en el grupo de MK-801, 5 de 12 animales no presentaron ninguna crisis conductual y en el EEG sólo se observó la presencia de actividad parecida a grupos de ondas lentas sin que estas se asociaran con cambios en la conducta de los animales.

GRUPO II : MICROINYECCIÓN DE AP-7

En lo que se refiere al grupo en el que se aplicó la microinyección unilateral de AP-7 (9.0 nMol /0.2 µl) en la FRP, 7 de 8 ratas presentaron primero giro de cabeza y después de cuerpo ipsi y contralateral al sitio de inyección, en el registro del EEG no se apreciaron cambios. Con la inyección de PTZ y al mismo tiempo en que se presentó la CTCG aparece una postdescarga en el EEG de duración amplia (fig. 7). Respecto a las crisis, los resultados muestran que aunque se observó una latencia de 6.6 min a la CTCG (ver Tabla II) y un retardo a la aparición de la primer CTCG del 412 % (ver Tabla IV), este cambio no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control. Conductualmente se observó que el 100% de los animales presentaron CTCG, es decir, presentaron mioclonías de miembros anteriores y posteriores con pérdida del equilibrio y caída. Los sitios de microinyección estuvieron entre las coordenadas AP= -9.8 y -10.8 respecto a bregma, donde se localiza el núcleo reticularis pontis caudalis según el atlas de Paxinos y Watson (fig. 8).

GRUPO III : MICROINYECCIÓN DE MK-801

Con relación al grupo en el que se aplicó la microinyección unilateral de MK-801 (6.0 nMol) en la FRP no se observó la conducta de giro como sucedió en el grupo de AP-7, ni la alteración del registro electroencefalográfico. En este grupo se encontró un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.0021$) en la latencia a la primer CTCG con respecto al grupo control ya que ésta apareció a los 46.6 minutos (ver Tabla II). En este grupo se encontró que el 42% de los animales no presentaron ninguna

**SITIOS DE MICROINYECCION DE AP-7 EN
LA FRP DE LA RATA**



● convulsionaron.

○ aumentó la latencia.

Fig. 8 En este esquema se muestra una serie de cortes coronales de la FRP de la rata según el atlas de Paxinos, donde se señala la distribución de los sitios de microinyección unilateral de AP-7. Las coordenadas AP señaladas, son a partir del punto de referencia Bregma. Los círculos llenos muestran los sitios donde se presentó un aumento en la latencia a la crisis pero este cambio no fue significativo. Como se puede apreciar la mayoría de los sitios de inyección están localizados del núcleo reticularis pontis caudalis.

CTCG^{**}, este cambio es estadísticamente significativo ($p < 0.001$) (ver tabla V). Con respecto al EEG, no se observaron cambios después de la aplicación del MK-801, al inyectar el PTZ el 58% de las ratas presentaron actividad convulsiva tanto en el EEG como conductualmente, sin embargo en las ratas que no convulsionaron se observó una disminución en la duración de la postdescarga encontrándose en los animales conducta normal (ver fig 7). Se realizó un análisis estadístico del grupo de animales que sí convulsionaron respecto a la latencia a la 1er CTCG comparándolo con el grupo control al que se le aplicó el vehículo y se encontró que de todas formas hubo un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.004$) a la aparición de las crisis (Tabla III)

Los sitios de la microinyección de MK-801 en los cuales hubo supresión de las crisis se localizaron dentro del área del núcleo reticularis pontis caudalis en las coordenadas AP[≈] - 9.3 y -10.3 del atlas de Paxinos y Watson y en un animal el sitio de la microinyección se localizó en la parte dorsal del reticularis pontis caudalis, ventral al trayecto del séptimo par (ver fig 9).

^{**}Para el análisis estadístico en el grupo de microinyección de MK-801, a los animales que no convulsionaron en el tiempo que duró el estudio (90 minutos posterior a la inyección de PTZ), se les asignó una latencia de 90 min a la 1er CTCG.

**SITIOS DE MICROINYECCION DE MK-801 EN
LA FRP DE LA RATA**

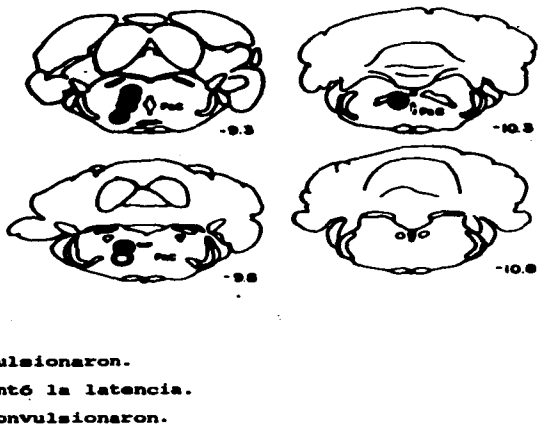


Fig. 9 En este esquema se muestra una serie de cortes coronales de la FRP de la rata según el atlas de Paxinos, donde se señala la distribución de los sitios de microinyección unilateral de MK-801. Las coordenadas AP señaladas, son a partir del punto de referencia Bregma. Los círculos vacíos muestran los sitios en donde el MK-801 no tuvo efecto protector sobre las crisis, los que tienen líneas diagonales tuvieron un aumento en la latencia a la crisis y los llenos muestran los sitios donde el MK-801 inhibió las crisis provocadas con PTZ. Como se puede apreciar la mayoría de los sitios de inyección están localizados dentro del núcleo reticularis pontis caudalis.

T A B L A II

Latencia promedio a la 1er CTCG (min)

	n	$\bar{x} \pm E.E$	D.S	ANOVA
Salina	8	1.9 \pm 0.5	1.45	-
AP-7	8	6.6 \pm 3.6	10.18	N.S
MK-801	12	46.6 \pm 11.9	41.2	7.95 **

** $p < 0.0021$

En esta tabla se muestra el tiempo promedio expresado en minutos que tardaron los animales en presentar la primera CTCG provocada con la administración de PTZ (70 mg/kg i.p). Se puede observar que en el grupo con microinyección de AP-7 (9.0 nMolas/ 0.2 μ L), no hubo cambio estadísticamente significativo en la latencia con respecto al control, al cual se le inyectó solución salina amortiguada a pH 7.4 que fue el vehículo en el que se disolvieron los fármacos, los animales tratados con MK-801 (6.0 nMolas/ 0.2 μ L), presentaron un aumento estadísticamente significativo en la latencia a la aparición de la primera CTCG ($p < 0.0021$) en relación con el grupo control y AP-7.

T A B L A III

**Latencia promedio a la 1er CTCG de los animales
que sí convulsionaron (min).**

	$F \pm E.E$	D.S	t
Salina n=8	1.9 \pm 0.5	1.45	-
MK-801 n=7	15.6 \pm 7.8	20.68	-1.88 *

* $p < 0.004$

En esta tabla se muestra que aún cuando se analiza el cambio en la latencia a la 1er CTCG en los animales que sí convulsionaron este cambio sí es estadísticamente significativo ($p < 0.004$), esto quiere decir que aunque los animales presentaron crisis éstas se vieron retrasadas respecto al grupo en el que se inyectó sólo el vehículo.

T A B L A I V**Porcentaje de retardo de las CTCG**

	n	tiempo (min)	% de retardo
Salina	8	1.6	-
AP-7	8	6.6	412.5
MK-801	12	46.6	2912.5

En esta tabla se muestra que aparentemente hay un retardo a la presentación de las crisis provocadas por FTZ con la inyección unilateral de AP-7 en la FRP, este cambio no fue estadísticamente significativo, sin embargo con la aplicación de MK-801 en la misma estructura, este cambio es mucho más acentuado (2912.5%) respecto al grupo control.

T A B L A V

Porcentaje de supresión de CTCG

	n	c/CTCG	s/CTCG	total	χ^2
Salina	8	100	0.0	100	-
AP-7	8	100	0.0	100	N.S
MK-801	12	58	42.0	100	97.67 *

* $p < 0.001$

Esta tabla muestra el porcentaje de protección con la microinyección unilateral de AP-7 y MK-801 en la FRP de las ratas, todos los animales que recibieron AP-7 presentaron CTCG y al grupo que se le aplicó MK-801 presentó una protección del 42% estadísticamente significativa, esto quiere decir que 5 de 12 animales no presentaron ninguna CTCG al aplicárseles PTZ.

DISCUSION

Los resultados obtenidos con las microinyecciones de MK-801 y AP-7 en la FRP, muestran que los antagonistas del receptor NMDA de tipo no-competitivo (MK-801) tienen un efecto protector contra las crisis provocadas con PTZ, no así los de tipo competitivo (como el AP-7). La distribución anatómica de los receptores de GLU en la FRP no es muy clara, pero se ha reportado en estudios de liberación en rebanadas de la FRP de la rata que el GLU se encuentra en niveles más altos que la Glicina y el GABA (Camacho-Arroyo, 1992), por lo tanto la transmisión glutamatérgica en la FRP puede jugar un papel importante en la excitación de algunas vías que pasan por la FRP. Además, los antagonistas competitivos y no-competitivos del receptor NMDA, han mostrado tener propiedades anticonvulsivantes en varios modelos experimentales de epilepsia (Lehmann, 1991); los antagonistas competitivos previenen las crisis provocadas con PTZ y con estimulación auditiva (Croucher et al, 1982), el kindling con PTZ (Corda et al, 1992), retardan el kindling con estimulación eléctrica, (Cain, 1989); en estos resultados, a diferencia de los nuestros, se aplica el AP-7 en forma sistémica, por lo que es difícil saber qué sustrato neuroanatómico es afectado. Para la localización de núcleos específicos en la regulación de la actividad epiléptica se han establecido metodologías como la microinyección estereotáxica en diferentes núcleos intracerebrales para poder definir cuales de estos sitios tienen la capacidad de suprimir, retardar o potenciar las crisis. Se están realizando estudios con antagonistas del receptor NMDA que tienen propiedades anticonvulsivantes para saber qué papel juegan en los diferentes sustratos neuroanatómicos en relación a la aparición o supresión de las crisis provocadas experimentalmente. Se ha reportado que el AP-7 (100 pmolas) en la Cx prepiriforme reduce las crisis clónicas provocadas con la microinyección de bicuculina, carbacol y ácido kainico en ese mismo sitio (Piredda, 1986), con la putrecina aplicada en la Cx prepiriforme profunda se provocan crisis, si se realiza

una microinyección de 20 pmol de AP-7 en esta misma estructura las crisis son prevenidas (De Sarro, 1993), aplicado en la Sustancia Nigra se suprime el componente tónico en las crisis por Electrochoque (De Sarro, 1985); se protegen las crisis provocadas por bicuculina, ácido kainico y carbacol al inyectar AP-7 en el área tempestas (Gale, 1989); aplicado en la sustancia innominata reduce la crisis conductual y en la amígdala kindleada aumenta el umbral a la postdescarga (Mori, 1989). En ratas genéticamente susceptibles a crisis audiogénicas el AP-7 y un análogo más potente, el CPP en el colículo inferior (CI) y en la FRP bloquean las crisis al someter a las ratas a estimulación auditiva, en este trabajo se encuentra que el AP-7 no tiene la misma potencia anticonvulsivante aplicado en diferentes sustratos anatómicos ya que en el CI se inyectaron 0.1 nMol bilateralmente y se suprimieron totalmente las crisis auditivas y en la FRP se necesitaron 12.5 nMol bilateralmente para obtener el mismo resultado (Faingold et al, 1992). Estos datos nos dan evidencias de que los antagonistas competitivos del receptor NMDA al unirse al sitio del receptor NMDA ya sea por vía sistémica o por inyección localizada en estructuras cerebrales específicas disminuyen la actividad convulsiva.

Los resultados encontrados en nuestro trabajo con la microinyección de AP-7 en la FRP indican que este antagonista no ejerce un efecto antiepiléptico en las crisis provocadas por PTZ, estos datos no concuerdan con los reportados por Faingold et al (1992) donde se suprimen las crisis audiogénicas, quizá este efecto se deba a que es un modelo de crisis diferente y que la vía de estimulación también es diferente ya que en el mismo trabajo de Faingold inyectando bilateralmente en el CI de 0.1 a 1.0 nMol de AP-7 suprime las crisis, es importante mencionar que con 0.1 nMol suprimió totalmente las crisis y con 1.0 nMol fue menor la reducción de las crisis; la dosis de AP-7 en la FRP para suprimir las crisis auditivas fue de 25 nMol que significaba un aumento en la concentración de 250 veces comparada con la aplicada en el CI.

En nuestro trabajo se muestra que tal vez los antagonistas competitivos de NMDA no ejercen control sobre estos núcleos de la FRP, ya que con la dosis utilizada (9.0 nMol) que cae dentro del rango utilizado por Faingold, no se suprime ninguno de los componentes de la crisis con PTZ, además con esta dosis utilizada se encontró que se provoca conducta de giro de cabeza y cuerpo ipsi y contralateral y al administrar el PTZ este efecto se potenciaba apareciendo un giro de barril que no nos permitía tener un registro adecuado de la actividad en el EEG, este efecto no se reporta en los trabajos con ratas susceptibles a las crisis auditivas y se esperaba que con el aumento de la concentración de AP-7 estos efectos se potenciaran, lo que no nos permitiría tener un registro adecuado del EEG

MK-801

Estudios previos reportan que el MK-801 tiene propiedades antiepilépticas cuando se aplica por cualquier vía de administración en animales sometidos a diferentes modelos experimentales de crisis epilépticas. Así, aplicado en forma intraperitoneal (i.p), previene el kindling con PTZ (Corda et al, 1992), y con estimulación eléctrica lo retarda pero no suprime las postdescargas, además este retardo se observó al administrar el MK-801 a dosis de 1-2 mg/kg que produce severa ataxia y sedación (Mintz, 1990; Morimoto et al, 1991), con la administración de 1-10 mg/kg se reportó que suprime de manera dosis-dependiente las crisis generalizadas con PTZ en ratas adultas sin afectar las crisis mínimas que se definen como la presencia de sacudidas de cabeza y miembros anteriores (Velisek et al, 1991), en ratas prepúberes se inyectó MK-801 de 0.2-1.0 mg/kg previamente al AK 10 mg/kg, y se encontró que no se altera el status epiléptico pero se redujo la susceptibilidad a las crisis provocadas por Fluorotil, un convulsivante volátil (Stafstrom, 1993), administrado 5 mg/kg i.p a cobayos, previa o posteriormente

al daño provocado por el status epiléptico con soman (agonista colinérgico), previno la aparición de crisis y daño cerebral (Sparenborg, 1992). En otro trabajo se mostró que el MK-801, la Ketamina y la PCP previenen en forma dosis-respuesta las crisis conductuales provocadas por AK 12 mg/kg, así como el daño de amígdala, tálamo, corteza piriforme y la región CA1 del hipocampo, pero no al área CA3 ni el septum lateral en ratas (Clifford, 1990). La administración de MK-801 más diazepam, protegieron contra el daño por status epiléptico provocado con litio y pilocarpina, a partir de estos últimos datos se ha propuesto que el MK-801 puede ser un agente útil para el tratamiento del status epiléptico refractario en humanos por su acción neuroprotectora y su habilidad de potenciar las drogas GABAérgicas (Walton, 1991). En todas estas investigaciones el MK-801 administrado por vía sistémica ha mostrado tener propiedades antiepilépticas, además se sabe que los antagonistas no-competitivos atraviesan la barrera hematoencefálica más fácilmente que los competitivos por lo que se necesita una dosis menor para proteger contra las crisis. Velisek, a partir de su observación en la que el MK-801 i.p suprime las crisis generalizadas pero no afecta las mioclonías de cabeza y miembros anteriores, apoya la teoría de la participación de diferentes sustratos neuroanatómicos en la generación y difusión de los diferentes tipos de crisis convulsivas propuesta por Browning (Velisek, 1991; Browning, 1987). En estos trabajos se demuestra que el MK-801 es capaz de retardar e inhibir las crisis epilépticas provocadas en varios de los modelos experimentales por lo que los autores proponen que el proceso epiléptico es mediado por la activación del receptor de GLU y específicamente por el receptor a NMDA. En otras líneas de investigación se han realizado microinyecciones de este fármaco en diferentes regiones intracerebrales con el objetivo de encontrar qué sustratos neuroanatómicos son más susceptibles a la regulación de las crisis por medio del receptor a NMDA. La microinyección de MK-801 (10 pmolas) en la Cx prepiriforme profunda redujo las crisis conductuales y electroencefalográficas provocadas con putresina unilateral aplicada en el mismo sitio (De Sarro, 1993), en este trabajo se muestra que los

receptoras NMDA en esa región del cerebro anterior como la Cx prepiriforme juegan un papel importante en la génesis de las crisis provocadas en ese sitio. Con el modelo de crisis audiogénicas en ratas, al realizar microinyecciones bilaterales de MK-801 (desde 0.02 hasta 40 nMol) en el CI se reportó que sólo a 40 nMol se suprimieron las crisis, mientras que el AP-7 las suprimió a una dosis de 0.1- 1.0 nmolas lo que contradice los reportes previos en donde se establece que el MK-801 es más potente que el AP-7, aplicado sistémicamente. Cuando se inyecta el MK-801 en la FRP a las dosis que no fueron efectivas en el CI se encuentra una protección de tipo dosis-respuesta sin que se supriman totalmente las crisis por lo que se supone que el MK-801 no parece ejercer su acción anticonvulsivante, en este modelo, en la vía auditiva sino que parece ejercerlo en estructuras diferentes como la FRP, esto parece ser debido a la diferente naturaleza de los receptores de NMDA en la FRP y el CI (Faingold et al, 1992). Los resultados que obtuvimos en nuestro experimento concuerdan con los encontrados por Faingold (1992) y De Sarro (1993) que muestran que el MK-801 aplicado en el cerebro protege contra las crisis provocadas experimentalmente. La diferencia con el trabajo de Faingold es que en nuestro caso utilizamos una dosis menor (6.0 nMolas) y la microinyección fue unilateral, además en el modelo que utilizamos con PTZ (que se encuentra dentro de las pruebas preclínicas que son utilizadas en todo el mundo en la prueba de eficacia de fármacos anticonvulsivantes) se obtuvo una completa supresión de las crisis en el 42% de los animales y un retardo a la aparición de la primer CTCG del 2912.5 % lo que nos hace suponer que los receptores NMDA en la FRP juegan un papel importante en la aparición y difusión de las crisis provocadas por PTZ.

En cuanto a la teoría de Gale y Browning (1988), en cuanto a que existen sustratos anatómicos que regulan diferencialmente los distintos tipos de conductas motoras como las mioclonías y la fase tónica de las crisis en este trabajo se encontró que el MK-801 suprimió todos los componentes conductuales de las crisis generalizadas ya que si, como establecen estos autores, la parte caudal del

tallo cerebral está encargada de la regulación de los componentes tónicos nosotros esperaríamos suprimir las mioclonías de miembros posteriores así como la extensión tónica, y que observaríamos las mioclonías faciales y de miembros anteriores características cuando se estimulan áreas cerebrales anteriores, lo que no se observó en nuestro trabajo. Lo que se desprende de este trabajo es que los antagonistas del receptor a NMDA de tipo no-competitivo en la FRP especialmente en el núcleo RPC tienen un papel importante en la aparición y la regulación de la actividad convulsiva generalizada.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que:

a) El AP-7 aplicado en la FRP, no ejerció un efecto protector contra las crisis por PTZ, ya que no se encontraron cambios estadísticamente significativos en la latencia a la aparición de la primer crisis con respecto al control, tampoco se encontró supresión de las mismas.

b) Con la microinyección de MK-801 en la FRP se encontró un aumento en la latencia a la aparición de la primer crisis, comparado contra el grupo control y el de AP-7, este cambio es estadísticamente significativo.

c) El MK-801 en la FRP produjo un porcentaje de retardo del 2912.5 % con respecto al grupo control.

d) Además del retardo a la aparición de las crisis, con la aplicación del MK-801 en la FRP se encontró que el 42% de los animales no presentaron ninguna crisis durante el tiempo de registro que fue de 90 minutos, este cambio es estadísticamente significativo.

e) Con estos resultados también se puede concluir que los receptores NMDA y específicamente los antagonistas no-competitivos en la FRP juegan un papel importante en la aparición como en la difusión de las crisis epilépticas provocadas por el PTZ.

BIBLIOGRAFIA

- Ayala, GF, Dichter, M, Gummit, RJ et al. 1973. Genesis of epileptic interictal spikes. New knowledge of cortical feedback systems suggests a neurophysiological of brief paroxysms. *Brain Research*. S2:1-17.
- Applegate, CD, Samoriaki, GM, y Burchfiel, JL. 1991. Evidence for the interaction of brainstem systems mediating seizure expression in kindling and electroconvulsive shock seizure models. *Epilepsy Res*. V10. pp 142-147.
- Ascher, P, Nowak, L. 1987. Electrophysiological studies of NMDA receptors. *Trends in Neurosciences*. 10 (7): 284-288.
- Aaser, P, Johnson, JW. 1989. The NMDA receptor, its channel, and its modulation by glycine. In Watkins, JC, Collingridge, GL. eds "The NMDA receptor". Oxford University Press. Oxford, England. pp 109-121.
- Avoli, M. 1991. Excitatory amino acid receptors in the human epileptogenic neocortex. *Epilepsy Research*. 10: 33-40.
- Browning, RA, Simonton, RL, Turner, FJ. 1981. Antagonism of experimentally induced tonic seizures following a lesion in the midbrain tegmentum. *Epilepsia*. 22:595-601.
- Browning, RA, Nelson, DK, Mogharreban, N, et al. 1985. Effect of midbrain and pontine tegmental lesions on audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia*. 26(2) 175-183.
- Browning, RA. 1987. Effect of lesion on seizures in experimental animals. [in] Fromm, GH, et al. eds. "Epilepsy and the Reticular Formation: The Role of the Reticular Core in Convulsive Seizures. Alan R. Liss, Inc. New York. pp 137.
- Browning, RA. 1992. Overview of neurotransmission: relationship to the action of antiepileptic drugs. [in] Faingold, CL., Fromm, GH. eds. "Drugs for control of epilepsy: Actions on neuronal networks involved in seizure disorders". CRC press. Boca Raton, Flo. USA. pp 23-56.
- Burnham, WM. 1987. Electrical stimulation studies: generalized convulsions triggered from the brainstem. [In] Fromm, GH, Faingold, CL, Browning, RA, Burnham, WM. (eds): "Epilepsy and the reticular formation: The role of the reticular core in convulsive seizures." Alan R. Liss, Inc., New York. pp 25-38.
- Cain, DP. 1989. Excitatory neurotransmitters in kindling: excitatory amino acid, cholinergic, and opiate mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Rev*. 13:269-276.
- Camacho-Arroyo, I, Tapia, R. 1992. Levels, uptake, and release of glycine and glutamate in the rat pontine reticular formation. *Neurochemical Research*. 17(5):463-467.

ESTA TESIS
SALIR DE

- Chapman, AG. 1991. Excitatory amino acid antagonists and therapy of epilepsy. [in] Meldrum, BS. ed. "Excitatory amino acid antagonists". Blackwell Scientific Publications. Oxford. London. pp 265-286.
- Clifford, DB, et al. 1990. Ketamine, phencyclidine, and MK-801 protect against Kainic Acid-induced seizure-related brain damage. *Epilepsia*. 31(4):382-390.
- Collingridge, GL, Bliss, TVP. 1987. NMDA receptors-their role in long-term potentiation. *Trends in Neurosciences*. 10(7):288-293.
- Corsora, BW, Gutnick, MJ. 1984. Cellular mechanisms of neocortical epileptogenesis in an acute experimental model. [in] Schwartzkroin, PA., Wheal, HV. eds. "Electrophysiology of epilepsy". Academic press. London. pp 89-105.
- Corda, MG, Orlandi, M, Lecca, D, Giorgi, O. 1992. Decrease in Gabaergic function induced by pentylenetetrazol kindling in rats: Antagonism by MK-801. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262:792-800.
- Cotman, CW, et al. 1987. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends in Neurosciences*. 10(7) pp 273-279.
- Cotman, CW, Iversen, LL. 1987. Excitatory amino acids in the brain- focus on NMDA receptors. *Trends in Neurosciences*. 10(7):263-265.
- Croucher, MJ, Collins, JF, y Meldrum, BS. 1982. Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. *Science*. V 216. 899-901.
- Crautzfeldt, O, Houchin, J. 1974. Neuronal basis of EEG waves. [in] Remond, A. (ed) "Handbook of Electroencephalography and Clinical Neurophysiology," Vol 2, Part C. Amsterdam: Elsevier, pp 5-55.
- Curtis, DR., Watkins, JC. 1960. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J. of Neurochem.* 6:117-141.
- De Deyn, PP, D'Hooge, R, Marescau, B, Pei, YQ. 1992. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsivants. *Epilepsy Res.* V12. pp 87-110.
- De Deyn, PP, McDonald, RL. 1989. Effect of antiepileptic drugs on GABA responses and on reduction of GABA responses by PTZ and DMCM on mouse neurons in cell culture. *Epilepsia*. 30: 318-328.
- De Sarro, G, Meldrum, B, Reavill, Ch. 1985. Anticonvulsant action of 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid in the substantia nigra. *Eur. Jour. of Pharmacology*. 106:175-179.
- Dichter, MA. 1994. Emerging insights into mechanisms of epilepsy: Implications for new antiepileptic drug development. *Epilepsia*. (suppl.4):S51-S57.

- Dreifuss, FE. 1981. Commission of Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. V22:489-501.
- Eadie, MJ, Tyrer, JH. 1989. Anticonvulsant therapy: Pharmacological basis and practice. Churchill Livingstone. NY. 3a. ed. Cap. IV. pp29-37.
- Engel, J. 1991. Clinical aspects of epilepsy. *Epilepsy Res*. V10. pp 9-17.
- Engel, J, Jr. 1992. Experimental animal models of epilepsy: classification and relevance to human epileptic phenomena. [in] Avanzini, G., Engel Jr, J., Fariello, R., Heinemann, U. eds."Neurotransmitters in epilepsy". *Epilepsy Res. Supp.* 8:9-20.
- Fagg, GE, Massieu, L. 1991. Excitatory amino acid receptor. In Meldrum, B.S. ed. "Excitatory amino acid antagonists". Blackwell Scientific Publications. Oxford, London. pp 39-63.
- Faingold, CL, Caspary, DM. 1987. Effect of convulsant drugs on the brain-stem. [In] Fromm, G.H., Faingold, CL, Browning, RA, Burnham, WM. (eds):"Epilepsy and the reticular formation: The role of the reticular core in convulsive seizures." Alan R. Liss, Inc., New York. pp 39-80.
- Faingold, C, Riaz, A. 1992. Neuronal networks in convulsant drug-induced seizures. [in] Faingold, CL, Fromm, GH. eds. "Drugs for control of epilepsy: Actions on neuronal networks involved in seizure disorders". CRC press. Boca Raton, Flo. USA. pp 213-252.
- Faingold, CL, Naritoku, DK, Copley, CA, Randall, ME, et al. 1992. Glutamate in the inferior colliculus plays a critical role in audiogenic seizure initiation. *Epilepsy Res*. 13:95-105.
- Faingold, CL, Randall, ME, Naritoku, DK, Boersma Anderson, CA. 1993. Noncompetitive and competitive NMDA antagonist exert anticonvulsant effects by actions on different sites within the neuronal network for audiogenic seizures. *Exper. Neurol*. 119:198-204.
- Faroouqi, AA., Horrocks, AL. 1991. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Research Reviews*. 16:171-191.
- Ferrier, D. 1873. Experimental researches in cerebral physiology and pathology. West Riding Lunatic Asylum Medical Reports 3:30-96.
- Fisher, RS. 1989. Animal models of the epilepsias. *Brain Research Reviews*. V14 pp 245-278.
- Fisher, RS. 1991a. Animal models of the epilepsias. [in] Fisher, R.S., Coyle, J.T. eds. " Neurotransmitters and Epilepsy". Wiley-Liss, Inc. New York. pp 61-76.
- Fisher, RS. 1991b. Clinical overview of Epilepsy. [in] Fisher, R.S., Coyle, J.T. eds. "Neurotransmitters and epilepsy". Wiley-Liss, Inc. New York. pp 1-16.
- Fisher, RS. 1991c. Introduction to the excitatory amino acid system. *Epilepsy Res*. 10:3-8.

- Fowler, J, Partridge, D. 1984. Effect of Pentylentetrazol on inward currents of non-bursting neurons and its role in plateau formation. *Brain Res.* 304:47-58.
- Fonnum, F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. of Neurochem.* 42:1.
- Fromm, GH. 1987. The brain-stem and convulsions: Historical overview. [in] Fromm, GH, et al. eds. "Epilepsy and the Reticular Formation: The Role of the Reticular Core in Convulsive Seizures. Alan R. Liss, Inc. New York. pp 1-8.
- Gale, K, Browning, RA. 1988. Anatomical and neurochemical substrates of clonic and tonic seizures. [in] Dichter, MA. ed. "Mechanisms of epileptogenesis: the transition to seizure". ed. Plenum Press. New York. pp 111-152.
- Gale, K. 1989. GABA in epilepsy: The pharmacologic basis. *Epilepsia.* 30(Suppl. 3):S1-S11.
- Gloor, P, et al. 1982. The role of the limbic system in experimental phenomena of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* 12:129-144.
- Greckach, G, Becker, A, Matthies, H. 1990. Threshold to elicit seizures by picrotoxin is lowered in pentylentetrazol-kindled mice. *Neuropharmacology.* 29(11):1073-1074.
- Gross, RA. 1992. A brief history of epilepsy and its therapy in the western hemisphere. *Epilepsy Res.* 12:65-74.
- Halonen, T, Pitkänen, A, Partanen, J, et al. 1992. Amino acid levels in cerebrospinal fluid of rats after administration of pentylentetrazol. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C(1):21-25.
- Hayashi, T. 1952. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jn. J. Physiol.* 3:46-64.
- Headley, PM, Grillner, S. 1990. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends in pharmacological sciences.* 11:205-211.
- Holstege, G, Kuypers, HGJM, Dekker, JJ. 1977. The organization of the bulbar fibre connections to the trigeminal, facial and hypoglossal motor nuclei. II. an autoradiographic tracing study in cat. *Brain.* 100:265-286.
- Heinemann, U, et al. 1991. In vitro epileptiform activity: role of excitatory amino acids. *Epilepsy Res.* 10: 18-23.
- Iadarola, MJ, Gale, K. 1982. Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid. *Science.* 218: 1237-40.
- Johnson, JW, Aacher, P. 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain Neurons. *Nature.* 325: 529-531.

- Johnston, D, Brown, TH. 1984. Mechanisms of neuronal burst generation. [in] Schwartzkroin, PA, Wheal, HV. eds. "Electrophysiology of epilepsy". Academic press. London. pp 89-105.
- Kemp, JA, Foster, AC, Wong, EHF. 1987. Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptors. *Trends in Neurosciences*. 10(7):294-299.
- Kuypers, HGJM. 1981. Anatomy of the descending pathways. In Brookhart, JM, Mountcastle, VM. (eds): "The Handbook of Physiology, Section 1. The Nervous System, Vol. 2, Motor Control." Baltimore: American Physiological Society, pp 597-666.
- Lehmann, J. et al. 1991. NMDA receptors and their ion channels. [in] Fisher, RS, Coyle, JT. (eds): "Neurotransmitters and epilepsy". John Wiley & Sons, Inc. New York. pp 147-167.
- Lodge, D, Johnson, KM. 1990. Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. *Trends in Pharmacological Sciences*. 11:81-86.
- Löscher, W, Schmidt, D. 1988. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res*. 2:145-181.
- Löscher, W. et al. 1991. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylenetetrazole seizure models. *Epilepsy Res*. 8:171-189.
- Löscher, W. 1993. Basic aspects of epilepsy. *Current Opinion in Neurology and Neurosurgery*. 6: 223-232.
- MacDonald, RL. 1991. Antiepileptic drug actions on neurotransmitter receptors and ion channels. [in] Fisher, RS, Coyle, JT. eds. "Neurotransmitters and Epilepsy". Wiley-Liss. New York. pp 231-245.
- Mares, P, Veliack, L. 1992. N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)-induced seizures in developing rats. *Developmental Brain Research*. 65: 185-189.
- Mathis, C, Ungerer, A. 1992. Comparative analysis of seizures induced by intracerebroventricular administration of NMDA, Kainate and Quisqualate in mice. *Exp Brain Res*. 88: 277-282.
- Maycox, PR, Hell, JW., and Jahn, R. 1990. Amino acid neurotransmission; spotlight on synaptic vesicles. *Trends in Neurosci*. 13:83.
- Mayer, ML. 1991. Physiology and biophysics of the NMDA receptor channel complex. [in] Meldrum, BS. ed. "Excitatory Amino Acid Antagonists". 1a. ed. Blackwell Scientific Publications. pp 64-83.
- McGeer, PL, McGeer, EG. 1989. Amino acid neurotransmitters. [in] Siegel, GJ. et al. eds. "Basic Neurochemistry". 4a. ed. Raven Press. New York. pp 311-332.
- McLennan, H. 1982. Receptors for the excitatory amino acids in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*. 20:251-271.

- McNamara, JO. 1992. The neurobiological basis of epilepsy. *Trends in Neuroscience*. 15(10): 357-358.
- Meldrum, BS, Garthwaite, J. 1990. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in Pharmacology*. 11:379-387.
- Meldrum, BS. 1992. Anticonvulsant drugs with new mechanisms of action. [in] Faingold, CL., Fromm, GH. eds. "Drugs for control of epilepsy: Actions on neuronal networks involved in seizure disorders". CRC press. Boca Raton, Flo. USA. pp 485-495.
- Meldrum, B. 1993. Amino acids as dietary excitotoxins: a contribution to understanding neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*. 18:293-314.
- Miller, JW, Ferrendelli, JA. 1988. Some subcortical mechanisms involved in experimental generalized seizures. [in] Dichter, MA. ed. "Mechanisms of Epileptogenesis: The transition to seizure". Plenum Press. New York. 1988. pp 101-110.
- Mintz, M, Rose, JC, Herberg, LJ. 1990. The effect of the NMDA receptor antagonist, MK-801, on the course and outcome of kindling. *Pharmacol. Biochem. & Behavior*. 35: 815-821.
- Mirski, MA, Ferrendelli, JA. 1986. Anterior thalamic mediation of generalized pentylenetetrazol seizures. *Brain Res*. 399:212-223.
- Mirski, MA, Ferrendelli, JA. 1987. Interruption of the connections of the mammillary bodies protects against generalized pentylenetetrazol seizures in guinea pigs. *J. Neurosci*. 7:662-670.
- Monaghan, DT, Cotman, CW. 1989. Regional variations in NMDA receptor properties. [in] Watkins, JC, Collingridge, GL. (Eds). "The NMDA receptor". Oxford University Press. New York. pp 53-64.
- Mori, N, Wada, J. 1989. Suppression of amygdaloid kindled convulsion following unilateral injection of 2-amino-phosphonoheptanoic acid (2-AP5) into the substantia innominata of rats. *Brain Research*. 486:141-146.
- Morimoto, K, Katayama, K, Inoue, K, Sato, K. 1991. Effects of competitive and noncompetitive NMDA receptor antagonists on kindling and LTP. *Pharmacol. Biochem & Behavior*. 40:893-899.
- Moriyoshi, K. et al. 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*. 354:31-37.
- Nakanishi, S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 258:597-603.
- Newman, DB. 1985. Distinguishing rat brainstem reticulospinal nuclei by their neuronal morphology. I. Pontine and mesencephalic nuclei. *Journal of Hirnforsch*. 26:385-418.

- Nicholls, DG. 1989. Release of glutamate, aspartate and γ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 52:331.
- Olverman, HJ, Watkins, JC. 1989. NMDA agonists and competitive antagonists. [in] Watkins, JC., Collingridge, GL. (Eds). "The NMDA receptor". Oxford University Press. New York. pp 19-37.
- Paxinos, G, Watson, CH. 1982. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Australia.
- Fellmar, T, Wilson, W. 1977. Synaptic mechanisms of pentylenetetrazole: selectivity for chloride conductance. *Science.* 197:912-914.
- Peterson, SL. 1994. Localization of an anatomic substrate for the anticonvulsant activity induced by D-Cycloserine. *Epilepsia.* 35(5):933-938.
- Pinel, JP, Cheung, KF. 1977. Controlled demonstration of metrazol kindling. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 6:599-600.
- Firedda, S, Chun, R, Gale, K. 1985. Intracerebral site of convulsant action of bicuculline. *Life Sciences.* 36: 1295-1298.
- Firedda, S, Gale, K. 1986. Role of excitatory amino acid transmission in the genesis of seizures elicited from the deep prepiriform cortex. *Brain Res.* 377:205-210.
- Porter, RJ, Rogawski, MA. 1992. New antiepileptic drugs: from serendipity to rational discovery. *Epilepsia.* 33 (Suppl. 1):S1-S6.
- Prichard, J. 1971. Pentylenetetrazol-induced increase in chloride permeability of leech neurons. *Brain Res.* 27:414-417.
- Ramarjaneyulu, R, Ticku, MJ. 1984. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Eur. J. Pharmacol.* 98: 337-345.
- Richards, RK, Everett, GM. 1944. Analgesic and anticonvulsive properties of 3,5,5-trimethylisoxazolidine-2,4-dione (Tridione). *Fed Proc;* 3:39.
- Roberts, E, Chase, TN, Tower, DB, [Eds] 1976. GABA in Nervous System Function. New York: Raven Press.
- Rogawski, MA. 1992. The NMDA receptor, NMDA antagonists and epilepsy therapy. A status report. *Drugs.* 44(3):279-292.
- Role, LW, Kelly, JP. 1991. The brain stem: cranial nerve nuclei and the monoaminergic systems. [in] Kandel, ER, Schwartz, JH, Jessell, T. (eds). "Principles of neural science". Elsevier. New York. 683-699.

- Ronneengstrom, E, et al. 1992. Intracerebral microdialysis of extracellular amino acids in the human epileptic focus. *J Cereb Blood Flow Metab*; 12:873-876.
- Ruzicka, BB, Jhamandas KH. 1993. Excitatory amino acid action on the release of brain neurotransmitters and neuromodulators: Biochemical studies. *Progress in Neurobiology*. 40: 223-247.
- Schürzfel, G, Wolf, G, Pomrenque, U, Schmidt, W. 1992. Pentylentetrazol kindling and factors of glutamate transmitter metabolism in rat hippocampus. *Neuroscience*. 49(2):365-371.
- Sherwin, A, Robitaille, Y, Quesney, F, et al. 1988. Excitatory amino acids are elevated in human epileptic cerebral cortex. *Neurology*. 38:920-923.
- Sparenborg, S, Brennecke, LH, Jaax, NK, Braitman, DJ. 1992. Disozilpine (MK-801) arrests status epilepticus and prevents brain damage induced by soman. *Neuropharmacology*. 31(4):357-368.
- Speckman, E. and Caspersers, H. 1973. Paroxysmal depolarization and changes in action potentials induced by pentylentetrazol in isolated neurons of *Helix pomatia*. *Epilepsia*, 14:397-408.
- Sperling, MR. 1988. Electrophysiology of the interictal-ictal transition in humans. [in] Dichter, MA, ed. "Mechanisms of epileptogenesis: the transition to seizure". Plenum press. New York.
- Stafstrom, CE, Holmes, GL, Thompson, JL. 1993. MK-801 pretreatment reduces kainic acid-induced spontaneous seizures in prepubelescent rats. *Epilepsy Research*. 14:41-48.
- Trube, G, Netzer, R. 1994. Dextromethorphan: Cellular effects reducing neuronal hyperactivity. *Epilepsia*. 35(Suppl 5):S62-S67.
- Van der Kooy, D. 1987. The reticular core of the brain-stem and its descending pathways: Anatomy and function. [In] Fromm, GH, Faingold, CL, Browning, RA, Burnham, WM. (eds): "Epilepsy and the reticular formation: The role of the reticular core in convulsive seizures." Alan R. Liss, Inc., New York. pp 9-23.
- Velasco, F. et al. 1975. Specific and nonspecific multiple unit activities during the onset of pentylentetrazol seizures. I. Intact animals. *Epilepsia*. 16:207-214.
- Velasco, F, Velasco, M, Romo, R. 1982. Specific and non-specific multiple unit activities during pentylentetrazol seizures in animals with mesencephalic transections. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol*. 53:289.
- Velasco, F, Velasco, M, Romo, R. 1983. Push-pull perfusion of pentylentetrazol in the brain stem of "encephale isole" cats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol*. 56:521.
- Velisek, L, Veresová, S, Pavisobá, H, Mares, P. 1991. Excitatory amino acid antagonists and pentylentetrazol-induced seizures during ontogenesis. II.: The effects of MK-801. *Psychopharmacology*. 104:510-514.

- Vertes, RP. 1990. Fundamentals of brainstem anatomy: a behavioral perspective. [in] Klemm, WR, Vertes, RP. (eds). "Brainstem mechanisms of behavior". John Wiley & Sons, Inc., New York. pp 33-105.
- Watkins, JC. 1989. The NMDA receptor concept: origins and development, [in] Watkins, JC, Collingridge, GL. eds: "The NMDA receptor". Oxford University Press. New York. pp 1-18.
- Walton, NY, Treiman, DM. 1991. Motor and electroencephalographic response of refractory experimental status epilepticus in rats to treatment with MK-801, Diazepam, or MK-801 plus diazepam. *Brain Res.* 553. 97-104.
- Zhang, CL, Goveli, T, Heinemann, V. 1994. Effects of NMDA and AMPA-receptor antagonists on different forms of epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Epilepsia.* 35 (suppl 5):S68-S73.