

00387
8



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

EL NUCLEO RETICULARIS PONTIS CAUDALIS
COMO SITIO DE ACCION DE FARMACOS
ANTICONVULSIVANTES EN UN MODELO DE
CRISIS GENERALIZADAS PRODUCIDAS POR
PENTILENTETRAZOL EN LA RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

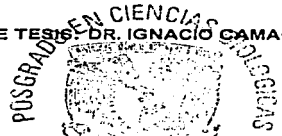
P R E S E N T A:

JOAQUIN MANJARREZ MARMOLEJO

DIRECTOR DE TESIS: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

MÉXICO, D. F.

ABRIL, 2003



COORDINACIÓN

A

TESIS CON
FALLA DE COCEN



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

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

A la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico el presente
intenido de mi trabajo
OMITRE: ROSALINDA GUEVARA
MARMOLEJO
FECHA: 07 ABRIL 2003
FIRMA: [Firma]

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 24 de febrero de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) Joaquín Manjarrez Marmolejo, con número de cuenta 76237078 y número de expediente 3991171, con la tesis titulada: "El núcleo Reticularis Pontis Caudalis como sitio de acción de fármacos anticonvulsivantes en un modelo de crisis generalizadas producidas por pentilentetrazol en la rata.", bajo la dirección del (la) Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Presidente:	Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
Vocal:	Dr. Camilo Ríos Castañeda
Vocal:	Dr. Gabriel Roldán Roldán
Vocal:	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Secretario:	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Suplente:	Dra. María Esther Cruz Beltrán
Suplente:	Dra. Clorinda Arias Alvarez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de febrero de 2003

[Firma]
Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

Las investigaciones de esta tesis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fisiología de la Formación Reticular, Unidad de Investigaciones Cerebrales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" dependiente de la Secretaría de Salud.

Deseo agradecer al Dr. Raúl Alvarado Calvillo por la oportunidad de realizar mi trabajo en el laboratorio a su digno cargo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a los integrantes de mi comité tutorial por su apoyo y espera:

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Y a los integrantes del comité que avala el presente trabajo de tesis:

Dra. Clorinda Arias Álvarez

Dr. Camilo Ríos Castañeda

Dr. Gabriel Roldán Roldán

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

0

TESIS CON
VALIA DE ORIGEN

DEDICATORIA

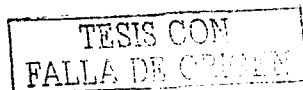
"..Y lo importante no es como está el camino, sino que para llegar a la meta pretendida hay que mantener firme la idea de llegar". Al fin y al cabo, los obstáculos que se atraviesan en el camino, se tienen que brincar o rodear, mas no evitar, si nos tropezamos hay que levantarse y seguir. Y cuando pensemos que hemos alcanzado la meta nos daremos cuenta de cuan largo es el camino y que sólo debemos seguir caminando.

"La adquisición del conocimiento científico no es riqueza material, por eso los que nos dedicamos a este negocio no somos ricos. Los que tenemos algún acceso a la cultura somos ricos de espíritu, de conciencia y de esta manera podemos ayudar al prójimo y al hacer lo que nos satisface se nos permite tener una vida en equilibrio y no morirnos en la completa apatía por no tener ese lujo que se llama conocimiento".

Este trabajo de varios años es dedicado a mis dos grandes orgullos y satisfacciones **DÁMARIS E. y JOAQUÍN**. Quiero que sepan que su padre los ama y respeta, esto será por siempre.

A mis padres **ENRIQUETA Y JOAQUÍN**, mención honorífica y a todas las personas que existen y forman parte de mi vida.

E



INDICE

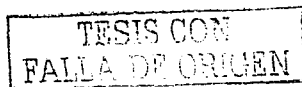
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA	6
FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS	9
LA FORMACIÓN RETICULAR Y LA EPILEPSIA	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
OBJETIVOS	22
HIPÓTESIS	23
METODOLOGÍA	24
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS	50

ANEXO: PUBLICACIÓN

Joaquín Manjarrez, Raúl Alvarado, Ignacio Camacho-Arroyo. 2001.

"Differential effects of NMDA antagonists microinjections into the nucleus reticularis pontis caudalis on seizures induced by pentylenetetrazol in the rat". *Epilepsy Research* 46:39-44.

F



RESUMEN:

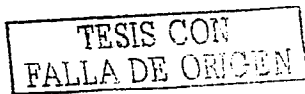
Durante muchos años, la Formación Reticular (FR) del tallo cerebral se ha reconocido por su capacidad para regular las crisis tónico-clónico generalizadas (CTCG) producidas por varios métodos de estimulación en animales de experimentación, uno de los núcleos de esta zona involucrado en este mecanismo es el núcleo reticularis pontis caudalis (PnC). Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado esta estructura como sitio de acción de fármacos antiepilépticos. Por lo que el objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de la administración de antagonistas del receptor a NMDA a Progesterona y a fármacos antiepilépticos de uso clínico en el PnC de la rata, sobre las crisis provocadas por pentilentetrazol (PTZ). La microinyección en el PnC de ((5R, 10S)-(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cicloheptén-5,10-imina) (MK-801), antagonista no-competitivo del receptor a NMDA disminuyó la incidencia de CTCG, mientras que el ácido 2-amino-7-fosfonoheptanoico (AP-7), antagonista competitivo de este receptor no modificó las CTCG. La microinyección de progesterona (P_4) en el PnC bloqueó las CTCG provocadas por PTZ. La microinyección de ácido valproico (VAP), inhibió las CTCG de manera dependiente de la dosis. Sin embargo, la microinyección en el PnC de Etosuximida (ETO), Carbamazepina (CBZ) y Difenhidantoina (DFH), fármacos antiepilépticos de uso clínico no tuvo efectos sobre las CTCG. Se concluye que el PnC de la FRP de la rata puede ser un sitio de acción de algunos fármacos antiepilépticos en el modelo experimental de crisis por PTZ. Por lo que sugerimos la participación de los aminoácidos excitadores, del GABA y de las prostaglandinas en la regulación de las CTCG a través de su acción en el PnC.

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

The brainstem reticular formation has been recognized for its capacity to regulate generalized tonic-clonic seizures (GTCS) induced by many stimuli in experimental animals. Specific nuclei of the pontine reticular formation, such as the nucleus reticularis pontis caudalis (PnC) are involved in the regulation of GTCS. However, the effects of antiepileptic drugs in PnC upon GTCS induced by the systemic administration of pentylenetetrazole (PTZ) have not been explored. The aim of this work was to evaluate the effect of MK-801 a non competitive NMDA receptor antagonist, AP-7 a competitive NMDA receptor antagonist, progesterone and clinical anticonvulsants Ethosuximide, Valproic acid, Carbamazepine and Diphenylhydantoin microinjections into the rat PnC on seizures induced by PTZ. The unilateral microinjection of MK-801 into the PnC reduced the incidence of GTCS, whereas AP-7 had no effect on the GTCS. Progesterone microinjection into PnC protected against the PTZ seizures. The microinjection of valproic acid induced a dose-related protection against PTZ seizures. However, Ethosuximide, Carbamazepine and Diphenylhydantoin microinjection had no effects on GTCS. In conclusion, the rat PnC nucleus is a target for some antiepileptic drugs in the PTZ seizures model. This results suggest the participation of excitatory aminoacids, GABA and progestins on GTCS regulation through their action on PnC nucleus.

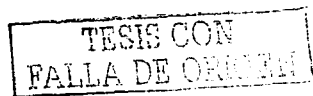


INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un problema de salud pública ya que del 1-1.5% de la población mundial tiene este padecimiento. De este porcentaje, entre el 25-30% de las personas con epilepsia son refractarios a los medicamentos, esto quiere decir que este porcentaje tiene una alta probabilidad de requerir cirugía para extirpar el área epileptogénica, que por lo general es el lóbulo temporal. Por lo tanto es muy importante que se genere conocimiento nuevo acerca de otras estrategias para controlar la actividad epileptica.

En la actualidad se conoce muy poco acerca de los sitios del sistema nervioso central sobre los que actúan los fármacos de uso común en el control de los diferentes tipos de crisis epilépticas. Uno de los aspectos importantes para abordar este problema es el uso de modelos experimentales con animales en los cuales se pueden inducir bajo condiciones controladas diferentes tipos de crisis epilépticas (Fisher, 1989). Los hallazgos encontrados con estos modelos se pueden extrapolar hacia la búsqueda de nuevas técnicas o nuevos tratamientos para el control de la epilepsia (De Deyn et al., 1992).

La investigación básica ha demostrado que los fármacos de uso clínico son efectivos en la supresión de crisis convulsivas en los modelos experimentales de epilepsia (Löscher y Schmidt, 1988). Se ha propuesto que las crisis generalizadas son reguladas por estructuras del tallo cerebral, en especial la Formación Reticular. En este trabajo se muestran resultados que indican que los fármacos antiepilepticos útiles para el tratamiento de las crisis generalizadas pueden tener efectos diferenciales en una misma estructura importante en la regulación de las crisis generalizadas como el núcleo reticularis pontis caudalis



ANTECEDENTES

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.

La principal terapia para controlar la epilepsia se basa en la administración sistémica de fármacos antiepilépticos (FAE). Se sabe que el tratamiento depende del tipo de crisis que padezca el paciente epiléptico (Dodson, 1998), (Tabla 1). Aproximadamente del 25-30% de las personas con epilepsia no responden o no toleran los FAE sistémicos (Deckers et al, 2000).

En las últimas décadas se han realizado investigaciones que utilizan como blanco a los diferentes receptores de los neurotransmisores que están involucrados en la génesis del proceso epiléptico, principalmente los receptores excitadores como el glutamato (GLU) o inhibidores como el ácido γ -amino butírico (GABA) (Meldrum, 1996; 1998; 1999; Meldrum y Chapman, 1999; Czuczwar y Patsalos, 2001; Temkin et al, 2001). No obstante, se requieren nuevos métodos para tratar a los diferentes tipos de crisis que ocurren en pacientes epilépticos. Uno de estos consiste en la microinyección local de compuestos con actividad antiepiléptica directamente en el tejido cerebral epiléptico para reducir o suprimir las crisis (Eder et al, 1997).

Las crisis se clasifican dependiendo de su sitio de inicio en: parciales (focales) o generalizadas. Las parciales se dividen en simples -sin pérdida de la conciencia- y complejas con pérdida o entorpecimiento de la conciencia. Las generalizadas se dividen en: 1) ausencias que pueden presentarse con una breve fijación al vacío o con breves automatismos y actividades motoras como sacudidas de párpados y 2) tónico-clónicas con caídas, rigidez y sacudidas acompañadas con pérdida de conciencia y a veces con incontinencia urinaria.

Tabla 1

Fármacos antiepilépticos efectivos contra crisis parciales y generalizadas *.

Crisis parciales y generalizadas tónico-clónicas	Crisis de ausencias	Crisis mioclónicas
Carbamazepina	Acetazolamida	Acetazolamida
Clobazam	Clonazepam	Clonazepam
Clorazepato	Ethosuximida	Felbamato
Clonazepam	Trimetadiona*	Lamotrigina
Gabapentina	Valproato	Fenobarbital
Lamotrigina		Ácido valproico
Metsuximida		Vigabatrina
Oxcarbazepina		
Fenobarbital		
Fenitoína		
Primidona		
Tiagabina		
Topiramato		
Valproato		
Vigabatrina		
Zonisamida		

* La trimetadiona está contraindicada en mujeres embarazadas ya que es altamente teratogénica.

* Tomada de Dodson, 1998.

Existen además otros subtipos de crisis generalizadas, mioclónicas, tónicas, clónicas, atónicas y hay algunas otras que no han podido ser clasificadas (Fisher, 1991).

La crisis, característica principal de la epilepsia, se produce 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).

MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA

Hasta la fecha, las consideraciones éticas para experimentar con el cerebro de pacientes epilépticos humanos ha sido la principal restricción que ha dificultado profundizar en el conocimiento de los mecanismos intrínsecos que generan y difunden las crisis epilépticas en el cerebro humano. Otra de las dificultades para estudiar los mecanismos del proceso epiléptico es que el inicio de las crisis en muchas formas de epilepsia generalizada en humanos y en animales de experimentación es repentina e impredecible. Una metodología importante para superar este problema utiliza modelos animales de crisis epilépticas que puedan ser iniciadas por un evento experimentalmente controlable. Estos modelos 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 la epilepsia o crisis epilépticas, 2) estudiar los mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos utilizados en la clínica, 3) estudiar las

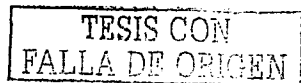
alteraciones en la eficacia de los fármacos durante el tratamiento crónico, 4) estudiar los mecanismos de resistencia de las crisis a los fármacos y 5) la búsqueda de nuevos fármacos antiepilépticos (Löscher, 1993). Con base en estos factores y a las variables a estudiar se debe elegir correctamente el tipo de crisis que se requiere inducir y la utilidad del modelo para contestar cualquiera de las preguntas anteriores (Fisher, 1989; 1991).

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

Con el fin de evaluar la eficacia de los fármacos con propiedades antiepilépticas de reciente síntesis y de uso común en el mercado se utilizan principalmente dos modelos de crisis convulsivas que son: el electrochoque máximo (ECH) y la administración sistémica de PTZ aplicados principalmente a roedores (Löscher y Schmidt, 1988; Löscher et al, 1991; De Deyn et al, 1992; Fisher, 1989; 1991); el tipo y severidad de las crisis producidas en estos modelos están relacionados con la intensidad de la corriente del estímulo del ECH y la dosis y ruta de administración del PTZ.

PENTILENTETRAZOL

El 6,7,8,9-tetrahidro-5H-tetrazol[1,5-a]azepina, también llamado Cardiazol, Metrazol o pentilentetrazol (PTZ), es un derivado del tetrazol con acción convulsivante utilizado desde la década de 1940 (Richards y Everet, 1944). Se ha reportado que la trimetadiona es capaz de prevenir las crisis inducidas por PTZ en



roedores. Por tanto, este modelo se ha utilizado para evaluar en roedores, gatos y primates, fármacos con propiedades anticonvulsivantes que son potencialmente útiles contra las crisis de ausencias en humanos. Por ejemplo la etosuximida (ETO), fármaco utilizado en el tratamiento de las crisis de ausencia en humanos, previene las crisis provocadas por PTZ; mientras que la difenilhidantoína (DFH), fármaco utilizado para el tratamiento de crisis generalizadas tónico-clónicas en humanos, previene las crisis por ECH pero no las provocadas por PTZ en animales de experimentación. Como podemos observar, los fármacos que previenen las crisis por PTZ son potencialmente útiles para el tratamiento de las crisis de ausencias en seres humanos (Löscher y Schmidt, 1988; Löscher et al, 1991; Fisher, 1989; 1991; De Deyn et al, 1992).

A nivel molecular se ha informado que el PTZ se une al sitio de picrotoxina del complejo receptor GABA_A /Benzodiazepina (Ramanjaneyulu y Ticku, 1984). En neuronas de invertebrados, concentraciones milimolares de PTZ producen despolarizaciones paroxísticas (Speckman y Caspers, 1973; Fowler y Partridge, 1984) y alteran la conductancia del ion cloruro (Prichard, 1971; Pellmar y Wilson, 1977). En cultivos de neuronas de médula espinal de ratón se inhibe la conductancia del ion cloruro (De Deyn y Macdonald, 1989). El PTZ se ha utilizado como modelo de kindling químico, es decir a dosis subconvulsivas aplicadas en períodos de tiempo constantes puede inducir crisis parciales y secundariamente generalizadas (Pinel, 1977; Grecksch, 1990; Corda 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 de 50 a 100 mg/kg en ratones o ratas. Sus efectos se pueden observar desde menos de un minuto después de su administración y hasta los 30 minutos posteriores a ella. El tiempo de vida media del PTZ es de aproximadamente 3.8 horas manteniéndose constante la concentración intracerebral hasta 2 horas después de la primera crisis; 24 horas después de su administración las concentraciones cerebrales disminuyen en forma significativa

(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 a esas dosis y en un lapso de aproximadamente 2 minutos induce, por orden de aparición: a) sacudidas mioclónicas, b) mioclonías 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 pollespigas (Fisher, 1991; Löscher, 1991; De Deyn, 1992). El origen de esta actividad no se conoce con certeza pero se ha propuesto que se inicia en sitios subcorticales (Velasco et al, 1975; Mirski y Ferrendelli, 1986; 1987). También se ha demostrado que las concentraciones extracelulares de GLU, aspartato (ASP), glicina y taurina en el sistema nervioso central (SNC) aumentan como consecuencia de las crisis generalizadas provocadas por PTZ (Halonen et al, 1992).

FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS

A mediados del siglo XIX, se utilizaba el bromuro de potasio en la terapia anticonvulsivante; posteriormente se utilizó el fenobarbital y en 1938 Merrit y Putnam introdujeron el uso de la DFH que protegió a los animales contra las crisis por electrochoque máximo. Desde entonces se han probado una gran cantidad de compuestos y sólo algunos han sido aprobados para su uso en la clínica.

Debido a su participación en la epileptogénesis en animales de experimentación y en tejido de pacientes epilépticos, se han realizado muchas investigaciones valorando la efectividad de los antagonistas del receptor glutamatérgico a N-metil-D-aspartato (NMDA) en el control de las crisis epilépticas (Rogawski, 1992).

Se sabe que las crisis epilépticas pueden aparecer a causa del aumento del principal neurotransmisor excitador del SNC, el GLU y de la disminución del principal neurotransmisor inhibitorio, el ácido gama-amino butírico (GABA) (Gale, 1989; Avoli, 1991; Olsen y Avoli, 1997; Olsen y DeLorey, 1999). En este caso el

bloqueo del receptor al GABA provoca actividad epiléptica como se ha demostrado en varios modelos animales (Fariello et al, 1991; Meldrum y Chapman, 1999).

También se ha reportado que la administración sistémica de agonistas de GABA protege contra las crisis en varios modelos de epilepsia (Gale, 1989; Palmer et al, 1992; Deckers et al, 2000).

ETOSUXIMIDA

En seres humanos, la etosuximida (ETO) se utiliza para el control de las crisis epilépticas de ausencias (Bromfield, 1997). Se ha reportado que administrada por vía sistémica (65-125 mg/kg i.p.), protege contra las crisis por PTZ (Löscher et al, 1991; Mares, 1998), antagoniza el efecto del PTZ sobre la actividad epileptiforme inducida en la corteza entorrinal (Stringer, 1996). La microinyección bilateral de 100 nmolas de ETO en la FRP no protege contra las crisis provocadas por ECH (Peterson, 1996). Existen pocos estudios acerca de los sitios dentro del SNC en donde actúa la ETO, se ha reportado que aplicada en la sustancia nigra no protege contra las crisis provocadas por kindling (Leite et al, 1990). En la sustancia nigra, produjo un efecto proconvulsivo disminuyendo el umbral a las crisis (Turski et al, 1990). Hasta la fecha no se ha estudiado su efecto sobre las crisis por PTZ en el núcleo reticularis pontis caudalis (PnC).

ÁCIDO VALPROICO

El ácido n-propilpentanoico; valproico (VAP), se utiliza frecuentemente como la sal sódica, valproato de sodio. Esta molécula se conoce desde 1881, y su propiedad antiepiléptica se descubrió accidentalmente en Francia en 1961, ya que se utilizaba como solvente de agentes antiepilépticos. El VAP es particularmente

útil en las crisis generalizadas mioclónicas y de ausencias, previene las crisis febriles de la infancia y ayuda a controlar las CTCG. Puede ser útil en las crisis simples y parciales complejas. Este tiene la ventaja de ser menos sedante que otros fármacos antiepilépticos utilizados (Simon y Penry, 1975; Rowan, 1998).

En los modelos animales suprime las crisis fotomioclónicas de babuinos (Patry y Naquet, 1971). También protege contra las crisis audiogénicas en ratones (Simler et al, 1973), y las producidas por agentes que inhiben la neurotransmisión GABAérgica como PTZ, Bemegrída, Bicuculina y Estricnina (Frey y Löscher, 1976). Se ha reportado que es efectivo contra las crisis de ECH a dosis no tóxicas. La DE_{50} i.p. contra el ECH es de 169 mg/kg. en ratón y en rata 272 mg/kg. (Shenoy et al, 1982). También protege contra las crisis provocadas por un foco de cobalto en el hipocampo del gato (van Duijn y Beckman, 1975) y previene el desarrollo del kindling amigdalino en gatos y ratas (Leviel y Naquet, 1977; Salt et al, 1980).

Se piensa que los efectos del VAP están mediados por el aumento de las concentraciones del GABA (Godin et al, 1969; Simler et al, 1973; 1976; Elazar y Goldsfeld, 1975) debido a la inhibición de la enzima succinato semialdehído deshidrogenasa (Macdonald y Bergery, 1979), que cataliza la degradación del GABA. Inhibe a la enzima GABA transaminasa, involucrada también en la degradación del GABA (Godin et al, 1969; Simler et al, 1973). Se ha reportado que el VAP bloquea las corrientes de sodio por lo que la inhibición de los canales de sodio dependientes de voltaje es al menos uno de los posibles medios por el cual éste inhibe las crisis (Ragsdale y Avoli, 1998).

CARBAMAZEPINA

La 5-carbamil-5H-dibenz(b,f)azepina (Carbamazepina) (CBZ), se utiliza en el tratamiento de todas las formas de crisis simples parciales y complejas, así como en las CTCG. Tiene cierto grado de protección contra mioclonías, pero no es útil contra las ausencias (Mattson, 1998).

Se ha reportado con varios modelos experimentales de epilepsia que la CBZ protege contra las crisis fotomioclonicas en babuinos, pero sólo a dosis tóxicas (Meldrum et al, 1975), inhibe las crisis provocadas con estricnina y bicuculina (Theobald y Kunz, 1963; Blum et al, 1973), y aumenta el umbral para el ECH mínimo en ratones (Julien y Hollister, 1975; Blum et al, 1973). La CBZ previene las crisis focales inducidas en gatos con kindling (Wada et al, 1976); mientras que no provoca el mismo efecto en ratas con kindling amigdalino, aún en dosis tan altas que los animales presentaban coma (Wada, 1977). En otro trabajo se reportó que, en ratas, la CBZ previene las crisis secundariamente generalizadas (Albright y Bruni, 1984). En monos rhesus la CBZ protege contra crisis provocadas por focos de alúmina en el HPC y la Cx sensorimotora (David y Grewal, 1976), y contra las crisis inducidas por la estimulación de la Cx visual en gatos (Ito et al, 1977). La CBZ es relativamente inefectiva contra las crisis por PTZ (Theobald y Kunz, 1963).

Se ha propuesto que el probable mecanismo de acción de la CBZ es porque se une a los receptores cerebrales de benzodiazepinas, por lo que se

supone que sus efectos anticonvulsivantes podrían estar mediados a través de mecanismos relacionados con el receptor del GABA_A (Marangos et al, 1983; Skerritt et al, 1983b; De Lorenzo, 1984).

DIFENILHIDANTOINA

La 5,5-difenilhidantoína, difenilhidantoína (DFH), fue reportada por primera vez como anticonvulsivante en el modelo de ECH en 1938 (Merrit y Putnam, 1938). En humanos, es efectiva para controlar todas las variedades de crisis parciales, ya sean secundariamente generalizadas o no (Louis, 1968; Majkowski et al, 1976). Es útil para el tratamiento de las crisis generalizadas principalmente tónico-clónicas a excepción de las crisis de ausencias (Browne, 1998).

Actualmente se acepta que la DFH inhibe la difusión de la actividad epileptógena desde su sitio de origen pero probablemente no impide la iniciación de las descargas epilépticas. En gatos se reportó que a concentraciones terapéuticas, la DFH incrementó la frecuencia de disparo en un foco epiléptico inducido por penicilina (Bustamante et al, 1980). Edmonds et al, 1974, mostraron que la DFH no disminuye las postdescargas que se originan en los focos epileptogénicos corticales inducidos por penicilina en ratas.

Se sabe que la DFH se une a receptores específicos cerebrales (Spero, 1982). En el cerebro humano los diferentes sitios pueden contener una o dos clases de sitios de DFH (Spero, 1985). No se sabe exactamente como actúa a nivel de receptores para el bloqueo de las crisis. Sin embargo hay una interacción entre el sitio de unión de la DFH y el complejo receptor ionóforo de cloruro. También se ha observado que la DFH inhibe la unión del diazepam a receptores de BDZ y de ciertos ligandos a los canales iónicos de Na^+ . Se ha reportado que la DFH produce una caída en las concentraciones intracelulares de Na^+ , este mecanismo es el más aceptado mediante el cual la DFH produce sus efectos anticonvulsivos. Asimismo, existen estudios en los cuales se establece que también afecta la acción del Ca^{2+} uniéndose a los canales, disminuyendo la entrada de éste (Pincus y Lee, 1973). La DFH altera las concentraciones de varios neurotransmisores como GABA, ACh, 5-HT, NA y DOPA.

Existe la posibilidad de que la DFH ejerza su efecto anticonvulsivo vía eventos mediados por GABA ya que aumenta las concentraciones cerebrales de este neurotransmisor (Vernadakis y Woodbury, 1960; Saad et al, 1972; Mori, 1974); reduce la concentración cerebral de GLU, precursor del GABA; e incrementa la captura del GABA y su precursor GLU, en sinaptosomas de cerebro de rata (Weinberger et al, 1976).

MK-801 y AP-7

El glutamato (GLU), es el principal neurotransmisor excitador en el SNC; además se ha reconocido que el aumento de la transmisión glutamatérgica resulta en la aparición de actividad epiléptica tanto en animales como en seres humanos (Fisher, 1991; Olsen y DeLorey, 1999).

Los antagonistas del receptor a NMDA son aminoácidos análogos estructuralmente al GLU y al ASP, en los cuales el grupo amino de la cadena lateral es sustituido por un grupo "fosfono". Esta cadena de carbono puede ser lineal con un grupo amino (NH_2) en el carbono 2 y un carboxilo (COOH) terminal o bien pueden estar unidos grupos cíclicos de piperazina (Watkins et al, 1990; Chapman, 1991); se dividen en competitivos y no-competitivos.

Se ha informado que el ácido 2-amino-7-fosfonoheptanoico (AP-7), reduce y previene las crisis convulsivas inducidas en varios modelos experimentales de epilepsia. Aplicado intracerebroventricularmente (i.c.v.) previene las crisis provocadas por PTZ y con estimulación auditiva en ratones (Croucher, 1982), éste fue el primer trabajo donde se reportó que los antagonistas competitivos del receptor NMDA tienen propiedades antiepilépticas.

La aplicación bilateral de AP-7 en la sustancia negra suprime el componente tónico de las crisis producidas por ECH en forma dosis-dependiente (De Sarro et al, 1985). Al inyectar AP-7 de manera 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 ratas susceptibles genéticamente a crisis provocadas por estimulación auditiva, se encontró que con la microinyección bilateral de AP-7 en el colículo inferior y en la FRP se suprimieron las crisis (Faingold et al, 1992). En otro trabajo se informó que la administración sistémica de AP-7 provocó una reducción significativa en el disparo de las neuronas del colículo inferior sugiriendo que los antagonistas competitivos del receptor a NMDA juegan un

papel importante en esta estructura respecto a la regulación de las crisis (Faingold et al, 1993).

El MK-801, ((5R, 10S)-(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cicloheptén-5,10-imina), es uno de los primeros antagonistas no-competitivos del receptor NMDA descritos, que se podían usar "in vivo", en diferentes modelos de epilepsia en donde ha demostrado ser un antiepiléptico eficaz. Administrado en forma 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 con ratas se demostró que suprime de manera dosis-dependiente las crisis generalizadas provocadas por PTZ (Velisek et al, 1991). El MK-801 aplicado via intraperitoneal a ratas prepúberes 30 minutos antes de administrar ácido kaínico (AK) redujo las crisis y además disminuyó la susceptibilidad a las mismas provocadas por Fluorotil, un convulsivante volátil (Stafstrom et al, 1993). Administrado i.p a cobayos, antes o después del daño provocado por el estatus epiléptico con soman (agonista colinérgico), el MK-801 previno la aparición de crisis y de daño cerebral (Sparenborg et al, 1992).

En otro trabajo se mostró que el MK-801, la Ketamina y la Fenciclidina, otros antagonistas no-competitivos del receptor a NMDA, previenen en forma dependiente de la dosis las crisis conductuales y el daño 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, protegió contra el daño por estatus 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 anticonvulsivantes más potentes que los de tipo no-competitivo (Faingold, 1992).

La Progesterona y sus metabolitos

Existen muchos reportes que evidencian el papel de los neuroesteroides sobre la actividad epiléptica producida en diferentes modelos experimentales de epilepsia. La progesterona (P_4) aplicada sistémicamente induce anestesia en humanos y animales, incrementa el umbral a ECH y protege contra las crisis por PTZ y suprime el kindling (Bäckström y Rosciszewska, 1998; Mohammad et al, 1998). En gatas ovariectomizadas, las concentraciones plasmáticas de P_4 , equivalentes a los del embarazo, disminuyeron la frecuencia de espigas interictales de focos de penicilina (Landgren et al, 1978). La P_4 a concentraciones similares a los de la fase lútea del ciclo menstrual, redujeron significativamente la frecuencia de espigas interictales en mujeres con epilepsia parcial (Bäckström et al, 1984).

Los metabolitos reducidos de la P_4 en su posición 5 son potentes depresores del SNC, particularmente los esteroides con una molécula 3α -hidroxi-5-reducida (Dundee y Wyant, 1974; Figdor et al, 1957; Mok y Krieger, 1991), y se ha reportado también que presentan efectos anticonvulsivantes en varios modelos experimentales de epilepsia (Bäckström y Rosciszewska, 1998; Beyenburg et al, 2001). En ratas, la 5α -pregnan- 3α -ol, 20-ona (3α , 5α -P) fue alrededor de 8 veces más potente, en su acción anestésica que el metoexital un potente barbitúrico (Norberg et al, 1987). En gatas ovariectomizadas con un foco penicilínico, la 3α , 5α -P es más potente que el clonazepam para inhibir la actividad epiléptica (Landgren et al, 1987).

Se ha propuesto que el mecanismo de acción de la P_4 es a través de su acción inhibitoria directamente sobre los receptores del GABA, ya que se ha

encontrado que la P_4 se une aunque con poca afinidad al receptor GABA/BDZ, pero el $3\alpha,5\alpha$ -THP (Alopregnanolona) es un activador mucho más potente del canal de cloruro asociado al receptor del GABA (Majewska, 1992; Beyenburg et al, 2001).

LA FORMACIÓN RETICULAR Y LA EPILEPSIA

En los últimos años, se han llevado a cabo investigaciones sobre el papel de las redes neuronales del tallo cerebral (TC) como vías involucradas en la generalización de las crisis epilépticas. Se ha investigado la relevancia de las acciones de las drogas antiepilépticas sobre las vías del TC por su habilidad para bloquear el inicio y la propagación de las crisis. Durante muchos años se han realizado evaluaciones de los efectos de la inyección sistémica de drogas con efectos depresores y anticonvulsivantes sobre la Formación Reticular (FR). Se ha mostrado que la FR es extremadamente sensible a los efectos de los depresores del SNC (Syka et al, 1975; Shimoji et al, 1984).

Fromm ha realizado varios experimentos en neuronas del tallo cerebral y la aplicación sistémica de anticonvulsivantes (Fromm y Terrence, 1987). Estos estudios utilizaron las respuestas de las neuronas del TC a los estímulos aplicados dentro de otros núcleos que afectan la actividad de estas neuronas. Se observó una correlación entre el tipo de efecto producido y la eficacia clínica de cada una de las drogas anticonvulsivas evaluadas (Fromm, 1985). Así, los fármacos efectivos en el tratamiento de las crisis tónico-clónico generalizadas (gran mal) y parciales (focales) bloquearon sólo las vías que inhiben a las neuronas del tallo cerebral. Las drogas anticonvulsivantes efectivas en las crisis tónico-clónicas y de ausencias bloquearon las vías inhibitoras y excitadoras (Fromm y Terrence, 1987).

Las formas de epilepsia humana que ejercen los más profundos efectos sobre la conducta y la conciencia involucran la rápida generalización de la actividad neuronal anormal en todo el cerebro. Estas crisis empiezan en un foco de actividad anormal o pueden no tener un foco aparente, empezando esencialmente en forma simultánea en casi todo el cerebro. Para explicar el inicio simultáneo de las crisis generalizadas Penfield y Jasper (1954) propusieron la teoría centroencefálica, que sugiere que las crisis generalizadas se originan en el cerebro medio y el tallo cerebral superior, responsables de la integración de la función de los hemisferios cerebrales "Sistema integrador centroencefálico" (Penfield, 1954).

Varias de las redes neuronales del tallo cerebral que se supone juegan papeles importantes en el inicio y propagación de las crisis generalizadas incluyen a la FR. Esta colección de núcleos y tractos de fibras bulbares, pontinos y mesencefálicos que yacen bilateralmente en el centro del tegmento del TC, participan de manera fundamental en el control del sueño y la vigilia, el control autonómico y otras funciones vegetativas (Klemm, 1990). Esta estructura consiste de núcleos eslabonados entremezclados difusamente con tractos de fibras.

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). Se ha observado también que la FRM es más sensible que la corteza cerebral a la iniciación de las crisis provocadas localmente, es decir que el PTZ es más efectivo en la FRM que en la corteza cerebral (Velasco et al, 1983).

Las lesiones bilaterales de la FRP y de los pedúnculos cerebelosos atenúan los componentes tónicos provocados por electrochoque máximo y por

PTZ sin afectar las mioclonías de las crisis inducidas por PTZ o electrochoque mínimos (Browning et al, 1981a y b). Posteriormente, las lesiones del tegmento pontino que involucran al pedúnculo cerebeloso superior y al PnC, suprimen 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 son afectadas por esta misma lesión de la FRP (Browning, 1985; 1987).

Existen receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y no-NMDA en la FR Pontina y Bulbar (FRP, FRB) (Petrallia et al, 1994; Lai et al, 1995). Se ha demostrado que el glutamato (GLU) y aspartato (ASP) se encuentran en altas concentraciones en la FRP (Camacho y Tapia, 1992) y que la microinyección de sustancias con propiedades anticonvulsivantes en la FRP disminuye o bloquea las crisis epilépticas provocadas por abstinencia de etanol (Riaz y Faingold, 1994); audiogénicas (Faingold et al, 1992; 1994); ECH (Peterson, 1994; 1996). Un reporte reciente demostró que las microinyecciones de GLU en la FRP rostral potencia los efectos convulsivantes del carbacol (agonista colinérgico) y que esta potenciación es disminuida por MK-801 (Elazar y Berchanski, 2000).

Se ha reportado que el PnC tiene un papel importante en la supresión de las crisis audiogénicas, ya que con la microinyección bilateral de AP-7 (12.5 nmol) y MK-801 (1.6-20.0 nmol) disminuye la severidad de las crisis, siendo más potente el AP-7 proponiendo con estos resultados que los antagonistas del receptor a 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).

Hay evidencias que sugieren que estos núcleos son importantes en la regulación de las crisis tónico-clónico generalizadas (CTCG) provocadas por ECH o en animales genéticamente susceptibles a crisis audiogénicas (Browning et al, 1985; 1999).

Se ha informado que las crisis audiogénicas en ratas susceptibles genéticamente a crisis pueden ser reducidas por la microinyección de agonistas de GABA en el PnC (Faingold et al, 1994); en un trabajo con crisis por ECH, los agonistas de GABA como el muscimol y el baclofén, así como algunos fármacos antiepilépticos como la DPH, VAP, Fenobarbital, ETHO y felbamato aplicados en el PnO no protegieron contra las crisis (Peterson, 1996).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que se han logrado avances importantes sobre los mecanismos de acción de las sustancias anticonvulsivantes, hasta la fecha se desconocen los probables sitios de acción dentro del cerebro sobre los que éstas ejercen el control de la actividad epiléptica en animales de experimentación y en seres humanos.

Dada la importancia de la FRP en la epilepsia y particularmente del PnC en la aparición de las crisis generalizadas tónico-clónicas, en el presente trabajo se plantea realizar microinyecciones de fármacos con conocida actividad anticonvulsivante en el núcleo reticularis pontis caudalis (PnC), para verificar si éste es un sitio blanco para la regulación de la actividad epiléptica.

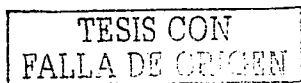
OBJETIVOS

El objetivo principal de esta investigación fue estudiar si el PnC es un sitio de acción de los fármacos antiepilépticos.

Los objetivos particulares fueron:

-Determinar si la microinyección de: ácido 2-amino-7-fosfonoheptanoico (AP-7); ((5R, 10S)-(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cicloheptén-5,10-imina) (MK-801); carbamazepina (CBZ); etosuximida (ETO); ácido valproico (VAP); difenilhidantoina (DFH) y progesterona (P₄), en el PnC modifica la actividad epiléptica inducida por PTZ en la rata.

-Determinar si la microinyección de: AP-7, MK-801, CBZ, ETO, VAP, DFH y P₄ en el PnC afecta la actividad electrográfica y conductual provocada por PTZ en la rata.



HIPÓTESIS

Si el PnC es una estructura que regula la aparición y propagación de las crisis epilépticas, entonces la microinyección de los fármacos antiepilépticos en el PnC reduce las crisis provocadas por PTZ.

METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas Wistar machos de 270-300 g, los animales se mantuvieron en un ciclo luz-oscuridad de 12:12 (con luz encendida de 7:00 a.m. a 7:00 p.m.) con alimento y agua ad libitum. Se anestesiaron con ketamina-xilazina (100 y 12 mg/kg. i.p). Fueron colocadas en el aparato estereotáxico (David Kopf) y con técnicas de asepsia se rasuró la cabeza y se realizó una incisión en la parte medial para descubrir el cráneo. Se retiró el tejido conjuntivo para dejar sólo el hueso y de esta forma tener a la vista el punto de intersección entre las suturas sagital y frontoparietal (punto Bregma). Con el uso de la torre estereotáxica, se marcó el sitio sobre el cráneo donde se realizó un trépano, se introdujo la cánula guía de acero inoxidable (calibre 25) dirigida al PnC. Esta cánula quedó 4 mm arriba del PnC. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas para la implantación de la cánula guía fueron 9.8 posterior, 1.0 lateral y 8.5 vertical desde la superficie del cráneo (Paxinos y Watson, 1998) con la barra de incisivos colocada a 3.5 mm debajo del cero interaural. En la entrada de la cánula guía se colocó un estilete para prevenir que se bloqueara la entrada. Además, se realizaron otros trépanos sobre el cráneo para colocar dos electrodos de acero inoxidable en la corteza motora, para el registro electrográfico y uno más en el hueso frontal como tierra. Por último se colocaron dos tornillos de acero inoxidable (Small Parts) en el cráneo. Los electrodos para registro de la actividad electroencefalográfica se soldaron a un conector hembra fabricado en el laboratorio y todo el dispositivo se fijó con acrílico dental. Al final de la cirugía se aplicó antibiótico local sobre la herida y se suturó la piel. Los animales se dejaron en recuperación en cajas individuales de acrílico durante siete días. Durante los primeros tres días post-cirugía a los animales se les administró antibiótico en el agua de beber (Baytril, Bayer).

Para la fase experimental los animales se colocaron, individualmente, en cajas de observación de acrílico transparente de 30 X 30 X 30 cm. Se conectaron mediante un cable aislado a un polígrafo Grass 78D y se registró su EEG con los animales despiertos y en libre movimiento durante 15 minutos. Posteriormente los animales fueron inyectados unilateralmente en el PnC con:

<i>Tratamiento</i>	<i>Dosis (nmolas)</i>
PBS, pH 7.4	--
AP-7	9, 18
MK-801	6, 12, 24
VAP	0.3, 0.6, 1.2 μ molas
ETO	141.5, 283.0
CBZ	38.0
DFH	73.0
P ₄	35

Todas las microinyecciones se realizaron en un volumen total de 0.2 μ l durante un minuto, utilizando una cánula de inyección de acero inoxidable calibre 32, conectada a una microjeringa Hamilton de 10 μ l por un tubo de polietileno. La cánula se dejó en el sitio de microinyección durante 3 minutos posteriores a la inyección y se registró el EEG y la conducta de los animales durante 30 minutos. Enseguida se inyectó el PTZ (SIGMA, 70 mg/kg. i.p), este se disolvió en salina normal (0.9%) a una concentración de 50 mg/ml y se administró como un bolo intraperitoneal. Esta dosis se utilizó con base en estudios previos para provocar CTCG después de su administración (Löscher et al, 1991; Fisher, 1989). Se continuó registrando la conducta y el EEG durante 90 minutos. En este estudio realizamos microinyecciones unilaterales, ya que en estudios previos se ha demostrado que la microinyección unilateral de varios compuestos es suficiente

para la reducción o inhibición de las crisis inducidas en diferentes modelos animales de epilepsia (Shehab et al, 1995, 1997; Walker et al, 1999).

Al final del experimento, se inyectó azul de Pontamina (SIGMA, 1.2 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) en el mismo sitio de microinyección. Se aplicó una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron por vía intracardiaca con salina y formalina al 3.7%. Se extrajeron los cerebros y se postfijaron en formalina al 3.7%. Los sitios de microinyección se verificaron en rebanadas coronales de 80 μm , teñidas con violeta de cresilo, con la ayuda del atlas de Paxinos y Watson (1998). Cada animal se utilizó una sola vez, y los experimentos fueron hechos de acuerdo a las Leyes Mexicanas de Protección Animal.

Se evaluó la respuesta conductual de los animales a la administración del PTZ, la latencia a la primer CTGG, la incidencia de CTGG, el porcentaje de sobrevivencia y las características de las postdescargas en el EEG. Las crisis por PTZ se caracterizaron por mioclonias faciales seguidas de mioclonias bilaterales de miembros anteriores y finalmente de CTGG con carreras de huida (wild running) y extensión tónica de miembros posteriores (Fisher, 1989). Los resultados se analizaron estadísticamente con las pruebas: exacta de Fisher y un análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey. Los valores de probabilidad fueron calculados con el programa SPSS para Windows versión 10.0.

RESULTADOS

En este estudio el exámen histológico mostró que los sitios de microinyección estuvieron localizados entre las coordenadas -9.3 y -10.04 en donde se encuentra el PnC según el atlas de Paxinos y Watson (1998) (Figs. 1 y 2). Los sitios que fueron localizados fuera del PnC ya sea dorsales, ventrales o más caudales no tuvieron ninguna influencia sobre los parámetros de crisis estudiados. Estos fueron, el núcleo trapezoide, el núcleo gigantocelular, el área tegmental dorsomedial y el núcleo abducens.

Efecto de la microinyección de vehículo

La microinyección de vehículo (PBS o β -ciclodextrina) no provocó alguna conducta que indicara que esta manipulación experimental en el PnC provocara efectos neurotóxicos (giro, ataxia, etc.) ni se presentaron cambios en el registro electrográfico de la corteza. Posterior a la administración de PTZ (70 mg/kg), el 100% de los animales presentó CTCG (Tabla 2) que se caracterizaron por mioclonias faciales, de miembros anteriores seguida de carreras de huida, terminando con la extensión tónica de los miembros posteriores. El 37.5% de los animales murió después de la crisis (Tabla 4). Después de la administración de PTZ se registraron postdescargas de gran duración y voltaje seguidas de un silencio postictal (Fig. 3).

Efecto de la microinyección de MK-801

La administración de MK-801, antagonista no-competitivo del receptor a NMDA, en el PnC protegió significativamente contra las CTCG provocadas por el PTZ de manera dependiente de la dosis. Con la dosis de 6 nmolas/0.2 μ l el 62.5% de los animales no presentó CTCG, mientras que con las dosis de 12 y 24

nmolas/0.2 μ l hubo una protección del 100% (Tabla 2). Las ratas inyectadas con las dosis de 12 y 24 nmolas/0.2 μ l sólo presentaron mioclonías faciales. Respecto a la latencia a la primer CTEG, se encontró que en las ratas con la dosis de 6 nmolas de MK-801 se presentó un retardo significativo en comparación con el vehículo (Tabla 3), mientras que con las dosis de 12 y 24 no hubo CTEG. La sobrevivencia de los animales posterior a la administración de PTZ también se aumentó en forma dependiente de la dosis (Tabla 4).

Respecto a la actividad electrográfica registrada en la corteza motora se observó que el MK-801 redujo evidentemente los eventos ictales inducidos por PTZ. Así, con la microinyección de MK-801 se observó una reducción en la amplitud, duración y frecuencia de las postdescargas en comparación con los animales que recibieron vehículo (Fig. 4).

Efecto de la microinyección de AP-7, ETO, CBZ y DFH

Las microinyecciones de AP-7, ETO, CBZ y DFH en el PnC no protegieron contra las crisis provocadas por PTZ (Tablas 2-4). Aunque con el AP-7 se observó un aumento en la latencia a la primer CTEG con la dosis de 9 nmolas este cambio no fue estadísticamente significativo (Tabla 3). El AP-7 en dosis de 9 nmolas indujo en todas las ratas conducta de giro ipsilateral al sitio de microinyección. Esta conducta se incrementó con la dosis más alta (18 nmolas/0.2 μ l), lo que hizo más difícil el registro y manipulación de los animales. La microinyección de ETO, CBZ y DFH no provocó conducta de giro en ningún animal de los grupos mencionados.

Se observó que después de la microinyección de ETO, CBZ y DFH en el PnC no hubo alteraciones ni en la actividad electrográfica de la corteza motora ni en la conducta de las ratas. Después de la aplicación del PTZ los animales presentaron CTEG asociadas a la presencia de postdescargas de gran amplitud, frecuencia y duración (Figs. 5-7)

Efecto de la microinyección de VAP

Con la microinyección de VAP en el PnC tampoco se presentaron conductas que evidenciaran neurotoxicidad (giro, ataxia, etc.) aún a las dosis más altas (0.6 y 1.2 μ molas/ 0.2 μ l).

El VAP produjo un aumento significativo de la protección a las CTCG sólo a las dosis de 0.6 y 1.2 μ molas (Tabla 2). El VAP a las dosis de 0.3 y 0.6 μ molas/0.2 μ l no produjo cambios significativos respecto a la latencia a la primera CTCG. Sin embargo con la microinyección de 1.2 μ molas se presentó un retardo a la primer CTCG (Tabla 3), y aumentó significativamente la sobrevivencia en las dosis de 0.6 y 1.2 μ molas (Tabla 4). Posterior a la aplicación del PTZ se observó la aparición de postdescargas de corta duración y frecuencia asociadas con mioclonías faciales (olfación) durante todo el registro, disminuyendo de frecuencia al final (Fig. 8).

Efecto de la microinyección de Progesterona

Se utilizó la microinyección de 35 nmolas/0.2 μ l de P₄ en el PnC ya que habíamos utilizado esa dosis en trabajos previos y no produjo efectos secundarios (giro, ataxia). La P₄ protegió al 87.5% de los animales contra las CTCG (Tabla 2), sólo 1 de 8 animales presentó CTCG con una latencia de 60.7 minutos (Tabla 3) y provocó un aumento significativo de la sobrevivencia en un 100% (Tabla 4). Posterior a la aplicación de PTZ se observó la aparición de postdescargas de bajo voltaje y corta duración y frecuencia asociadas con mioclonías faciales (olfación) durante todo el registro disminuyendo de frecuencia al final (Fig. 9).

Tabla 2

Efectos de la microinyección de anticonvulsivantes en el núcleo reticularis pontis caudalis sobre las crisis tónico-clónicas generalizadas inducidas por PTZ ^a

Tratamiento	# de animales con CTCG	% de protección
Vehículo (PBS)	8/8	0
AP-7		
9 nmol	8/8	0
18 nmol	8/8	0
MK-801		
6 nmol	3/8	62.5 ^b
12 nmol	0/8	100.0 ^c
24 nmol	0/8	100.0 ^c
VAP		
0.3 µmol	7/8	12.5
0.6 µmol	4/8	50.0 ^b
1.2 µmol	2/8	75.0 ^c
ETO		
141.5 nmol	7/8	12.5
283.0 nmol	7/8	12.5
CBZ		
38.0 nmol	8/8	0
DFH		
73 nmol	8/8	0
P ₄		
35 nmol	1/8	87.5 ^c

^a Todos los fármacos se inyectaron en un volumen de 0.2 µl en el PnC de la rata. Los animales fueron inyectados con PTZ (70 mg/kg. i.p) 30 minutos después.

^b $P < 0.05$

^c $P < 0.01$ comparado con el vehículo (Prueba exacta de Fisher).

Tabla 3

Efectos de las microinyecciones de anticonvulsivantes en el núcleo reticularis pontis caudalis sobre la latencia a la primer crisis tónico-clónico generalizada inducida por PTZ^a

Tratamiento	Latencia (min.)
Vehículo (PBS)	1.9 ± 0.5
AP-7	
9 nmol	6.6 ± 3.6
18 nmol	2.4 ± 0.5
MK-801	
6 nmol	8.7 ± 3.5 ^b
12 nmol	no CTCG
24 nmol	no CTCG
VAP	
0.3 µmol	2.2 ± 0.2
0.6 µmol	1.6 ± 0.3
1.2 µmol	11.7 ± 3.0 ^b
ETO	
141.5 nmol	4.4 ± 1.4
283.0 nmol	3.2 ± 1.2
CBZ	
38.0 nmol	2.6 ± 1.2
DFH	
73 nmol	1.5 ± 0.2
P ₄	
35 nmol	60.7 ^c

^a Todos los fármacos se inyectaron en un volumen de 0.2 µl en el PnC de la rata. Los valores de latencia están expresados como promedio ± EE (n=8).

^b P < 0.05 comparado con el vehículo (Prueba de Tukey).

^c No se presenta el dato de E.E porque sólo un animal presentó CTCG.

Tabla 4

Efecto de las microinyecciones de anticonvulsivantes en el núcleo reticularis pontis caudalis sobre la sobrevivencia de las ratas después de las crisis tónico-clónico generalizadas inducidas por PTZ^a

Tratamiento	# de animales sobrevivientes	% de sobrevivencia
Vehículo (PBS)	3/8	37.5
AP-7		
9 nmol	2/8	25.0
18 nmol	3/8	37.5
MK-801		
6 nmol	7/8	87.5 ^b
12 nmol	8/8	100 ^c
24 nmol	8/8	100 ^c
VAP		
0.3 µmol	1/8	12.5
0.6 µmol	4/8	50.0 ^b
1.2 µmol	7/8	87.5 ^c
ETO		
141.5 nmol	1/8	12.5
283.0 nmol	1/8	12.5
CBZ		
38.0 nmol	1/8	12.5
DFH		
73 nmol	1/8	12.5
P ₁		
35 nmol	8/8	100 ^c

^a Todos los fármacos se inyectaron en un volumen de 0.2 µl en el PnC de la rata.

^b $P < 0.05$

^c $P < 0.01$ comparado con el vehículo (Prueba exacta de Fisher).

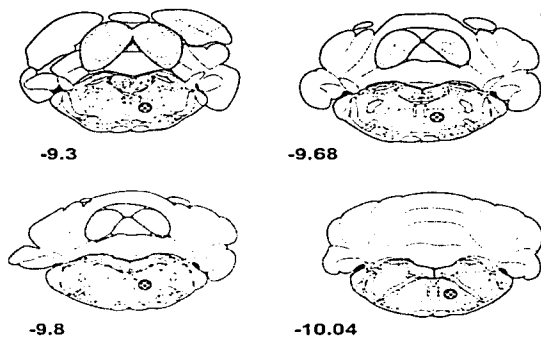


Figura 1. Sitios de microinyección en el PnC de la rata. En los esquemas se muestra la localización de los sitios de la microinyección de anticonvulsivantes en el PnC de la rata. Los esquemas y coordenadas fueron tomadas del atlas de Paxinos y Watson (1998). Todos los sitios correspondieron al PnC.

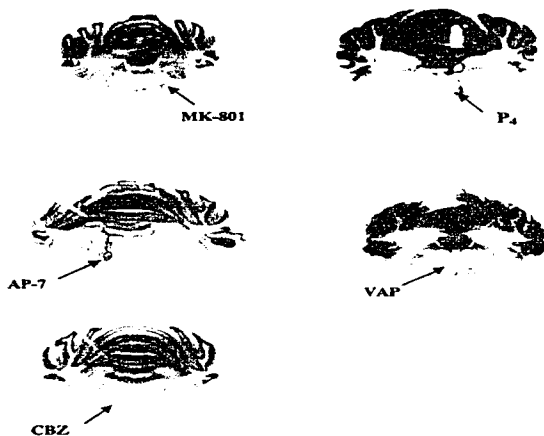


Figura 2. Cortes coronales del tallo cerebral de la rata teñidos con la técnica de Nissl. Se puede observar claramente la Formación Reticular Pontina. Se muestra en cada corte el sitio en donde se localizó la microinyección dentro del núcleo reticularis pontis caudalis (PnC) de los compuestos anticonvulsivantes (flechas). Se puede observar que el sitio de microinyección corresponde al PnC, localizado en la parte medio lateral, ventral al núcleo del sexto par y de las fibras del séptimo par cerebral.

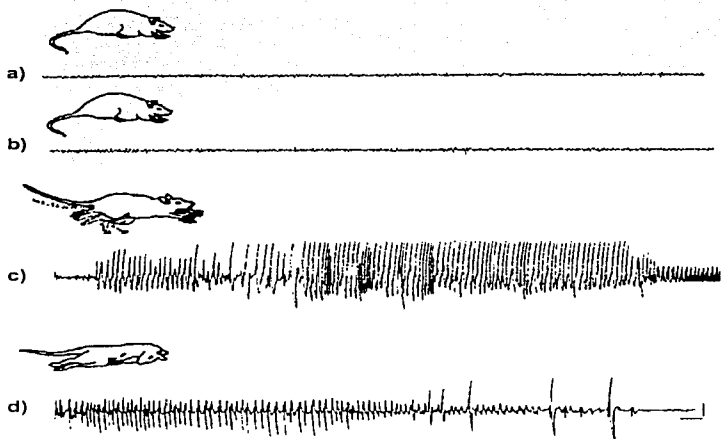


Figura 3. Registro de la actividad electrográfica de la corteza motora y de la actividad conductual de la rata en libre movimiento: efecto de la microinyección de Vehículo (PBS) en el PnC sobre las crisis inducidas por PTZ, a) registro control previo a la microinyección; b) posterior a la microinyección del vehículo fases en las que el animal presentó conducta normal sin giro ni signos de neurotoxicidad y c) aproximadamente 1 minuto después de la administración de PTZ (70 mg/kg i.p.) el animal presentó a la par con el registro electrográfico mioclonías de miembros anteriores y posteriores (carreras de huida) seguidos de d) extensión tónica de los miembros. *Calibración 0.5 mV y 1.0 segundo.*

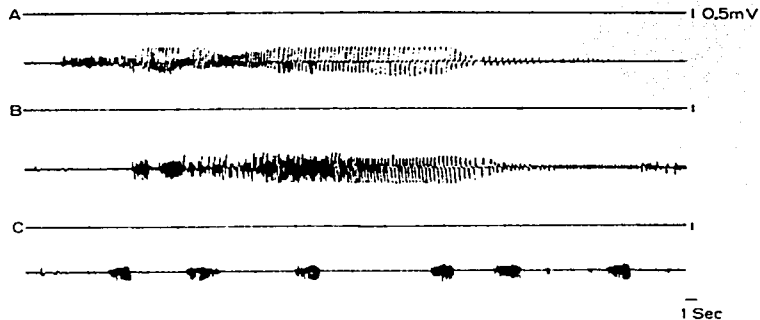


Figura 4. Registro típico de la actividad electrográfica de la corteza motora de la rata en libre movimiento antes y después de la administración de PTZ. A) Microinyección de Vehículo. B) Microinyección de AP-7 (9 nmolas) y C) Microinyección de MK-801 (6 nmolas) 4 minutos después de la administración de PTZ. Se obtuvieron registros similares con la microinyección de las dosis mayores de MK-801. Calibración 0.5 mV y 1.0 segundo.

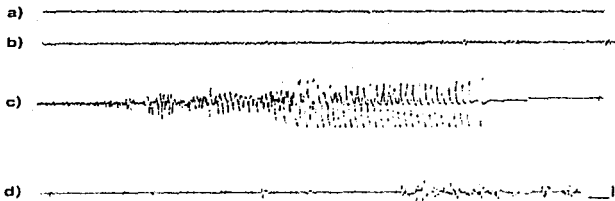


Figura 5. Registro típico de la actividad electrográfica de la corteza motora de la rata en libre movimiento: efecto de la microinyección de ETO en el PnC sobre las crisis inducidas por PTZ. a) Registro control previo a la microinyección; b) 5 minutos después de la microinyección de ETO (141.5 nmolas), no se presentan cambios en el EEG; c y d) 4 minutos después de la administración de PTZ se presentó la CTCTG y las conductas fueron similares a las del grupo control. Se obtuvieron registros similares con la microinyección de las diferentes dosis de ETO. Calibración 0.5 mV y 1.0 segundo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

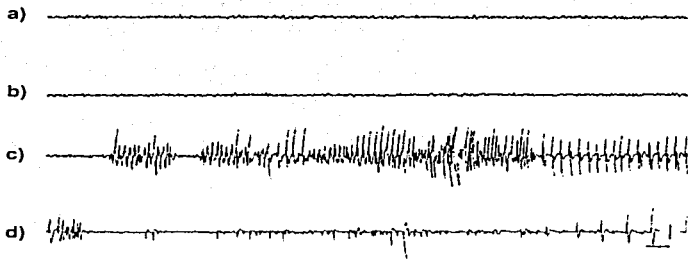


Figura 6. Registro típico de la actividad electrográfica de la corteza motora de la rata en libre movimiento: efecto de la microinyección de DFH en el PnC sobre las crisis inducidas por PTZ. a) Registro control previo a la microinyección; b) 5 minutos después de la microinyección de DFH (73 nmolas), c) 1 minuto después de la administración de PTZ se presentó la CTGG, continuó en d) . *Calibración 0.5 mV y 1.0 segundo.*

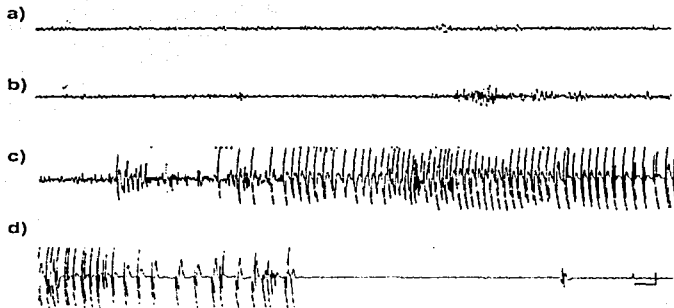


Figura 7. Registro típico de la actividad electrográfica de la corteza motora de la rata en libre movimiento: efecto de la microinyección de CBZ en el PnC sobre las crisis inducidas por PTZ. a) Registro control previo a la microinyección; b) 5 minutos después de la microinyección de DFH (38 nmolas). c y d) 1 minuto después de la administración de PTZ, aparece la CTCG. *Calibración 0.5 mV y 1.0 segundo.*

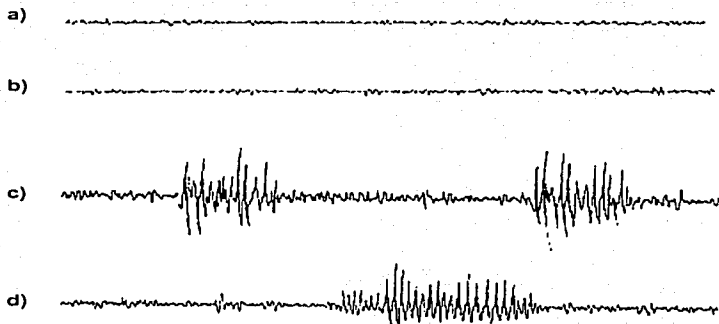


Figura 8. Registro de la actividad electrográfica de la corteza motora de la rata en libre movimiento: efecto de la microinyección de VAP en el PnC sobre las crisis inducidas por PTZ. a) Registro control previo a la microinyección; b) posterior a la microinyección de VAP (0.6 y 1.2 $\mu\text{mol}/0.2\mu\text{l}$), c) y d) 10 minutos después de la administración de PTZ (70 mg/kg i.p.). Se obtuvieron registros similares con la microinyección de las diferentes dosis de VAP. *Calibración 0.5 mV y 1.0 segundo.*

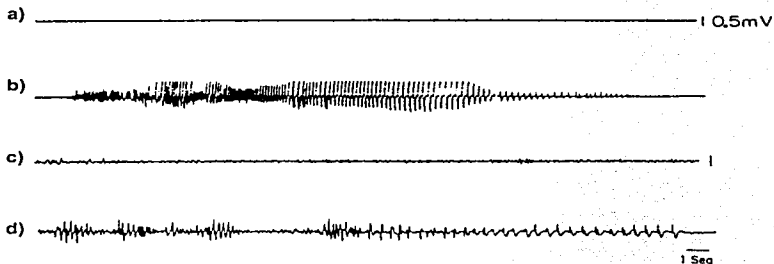


Figura 9. Registro de la actividad electrográfica de la corteza motora de la rata en libre movimiento: efecto de la microinyección de P_4 en el PnC sobre las crisis inducidas por PTZ. a) microinyección de vehículo, en este caso fue β -ciclodextrina que igual que el vehículo de PBS no afectó a las CTCG inducidas por PTZ (b). En c) se muestra la microinyección de P_4 , y en d) se puede observar la disminución del voltaje y frecuencia de las postdescargas inducidas por PTZ (70 mg/kg i.p.).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de este estudio mostraron que la microinyección unilateral de MK-801, VAP y P_4 en el PnC, bloquearon las CTCG inducidas por PTZ. La microinyección unilateral de AP-7, ETO, CBZ y DFH no ejercieron efectos anticonvulsivantes. Estos resultados apoyan los hallazgos encontrados en trabajos previos, que involucran a los receptores a NMDA y GABA con los mecanismos de regulación de la actividad convulsiva en la FRP (Faingold, 1992; 1994).

Se ha establecido que las conductas motoras como la fase de huida (wild running) y extensión tónica de miembros posteriores de las crisis generalizadas se encuentran reguladas por estructuras localizadas en la Formación Reticular Pontina y Mesencefálica con diferentes modelos de epilepsia (Browning, 1981; Velasco et al, 1982; Peterson, 1996; Faingold, 1998).

En este trabajo, las conductas motoras como la fase de huida (wild running) y extensión tónica de miembros posteriores de las crisis generalizadas, provocadas por PTZ, fueron similares a las inducidas con otros modelos de epilepsia generalizada (Peterson, 1996; Faingold, 1998).

Se ha reportado que los aminoácidos excitadores en el PnC participan en la regulación de la respuesta de levantamiento acústico (Krase et al, 1993; Miserendino y Davis, 1993) y en la presentación de la extensión tónica de miembros posteriores observada durante las crisis audiogénicas en ratas (Faingold et al, 1992). En este reporte mostramos que la neurotransmisión excitatoria mediada por el receptor a NMDA en el PnC está involucrada también en la generación de los componentes clónicos de las crisis generalizadas inducidas por PTZ, que es un modelo muy útil para probar drogas contra las crisis de ausencias en humanos (Löscher y Schmidt, 1988; De Deyn et al, 1992).

Aunque se ha propuesto que las estructuras caudales del tallo cerebral están involucradas solamente en la generación de los componentes tónicos de las

crisis (Browning, 1987; Burnham, 1987; Faingold y Caspary, 1987), nuestros resultados sugieren que el PnC podría también participar en las manifestaciones de las mioclonías, ya que ambos componentes electrográficos y conductuales de las crisis tónico clónico generalizadas inducidas por PTZ, que se han asociado con estructuras del cerebro anterior (Gale y Browning, 1988) fueron inhibidos por las microinyecciones de MK-801 en el PnC. Es posible que la circuitería neuronal involucrada en la regulación de los componentes tónicos y clónicos de las crisis en el PnC sean diferentes.

La posibilidad de que los efectos del AP-7 y del MK-801 en el PnC sean específicos para esta región es alta ya que las microinyecciones localizadas en el núcleo tegmental dorsal medial no tuvo efectos sobre las CTCG inducidas por PTZ.

Nosotros observamos una marcada diferencia entre los efectos del MK-801 y el AP-7 sobre las crisis inducidas por PTZ. El primero presentó propiedades claramente anticonvulsivantes, mientras que el último no sólo no presentó efectos anticonvulsivantes, sino que también provocó conducta de giro. Esta marcada diferencia en los efectos de los antagonistas competitivo (AP-7) y no-competitivo (MK-801) sobre la actividad cerebral ya ha sido observada. La administración sistémica de MK-801 protegió a las ratas contra las crisis inducidas por oxígeno hiperbárico, mientras que el AP-7 no ejerció ningún efecto sobre estas crisis (Chavko et al, 1998). En contraste, se ha reportado que la administración bilateral de AP-7 en el colículo inferior y en el PnC es más efectiva que el MK-801 sobre la reducción de las crisis audiogénicas (Faingold et al, 1992). También se ha reportado que la administración sistémica de AP-7 redujo el disparo neuronal del colículo inferior, mientras que el MK-801 no tuvo efectos (Faingold et al, 1993).

Aunque se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en los efectos diferenciales del MK-801 y del AP-7 sobre las crisis, estos pueden reflejar diferencias de ligamiento (binding) entre estos antagonistas en el PnC. También se ha hipotetizado que las diferencias en el funcionamiento del receptor a NMDA

pueden reflejar una heterogeneidad de la distribución del receptor a NMDA en el PnC (Faingold et al, 1993). También se ha mostrado que los antagonistas no-competitivos a NMDA incrementan el metabolismo cerebral y el flujo venoso cerebral (Rousell et al, 1992), mientras que los antagonistas competitivos tienen efectos opuestos (Clow et al, 1991). Los mecanismos involucrados en la inducción de la conducta de giro por el AP-7 requieren posterior investigación.

Se ha propuesto que las estructuras caudales del tallo cerebral como la Formación reticular Pontina y Mesencefálica están involucradas en la generación de los componentes tónicos y clónicos de las crisis generalizadas (Browning, 1987; Burnham, 1987; Faingold y Caspary, 1987; Elazar y Berchanski, 2000), nuestros resultados sugieren que la neurotransmisión de aminoácidos excitadores en el PnC podría participar en la aparición de los componentes tónicos y clónicos ya que los componentes electrográficos y conductuales de las crisis inducidas por PTZ fueron bloqueados por la microinyección de MK-801, antagonista no competitivo del receptor a NMDA. De esta manera, nuestros resultados indican que el antagonismo de los receptores a NMDA en especial del tipo no-competitivo es capaz de suprimir las CTCG en este modelo. Estos resultados apoyan a los reportados previamente (Faingold et al, 1992).

La diferencia es que en este experimento se realizaron microinyecciones unilaterales siendo estas suficientes para inhibir las CTCG de forma dependiente de la dosis. Además, se ha establecido que el sitio de origen de las CTCG es la FRM (Ishimoto et al, 2000; Hashizume et al, 2000), mientras que nuestros resultados sugieren que esta actividad se podría originar en estructuras del tallo cerebral más caudales ya que con la microinyección de sustancias con actividad anticonvulsiva en el PnC de la FRP pudimos suprimir la generación de las CTCG en comparación con los animales tratados con vehículo. Estos resultados apoyan a los reportados previamente (Faingold y Riaz, 1994) en los que reportan que las neuronas de la FRP aumentan su nivel de disparo previamente a la aparición de las crisis audiogénicas lo que indica que esta estructura es importante para la

propagación de las crisis audiogénicas; de la misma manera nuestros resultados apoyan y extienden los reportados anteriormente indicando que el PnC puede ser un sitio específico para la regulación de las CTGC. Nuestros datos apoyan estos hallazgos y además aumentan el conocimiento sobre los blancos terapéuticos más sensibles a los agentes antiepilépticos (Faingold y Randall, 1995; Faingold, 1998).

Nuestros resultados mostraron que además de suprimirse la actividad convulsiva conductualmente, la actividad electrográfica puede ser reducida ya que la microinyección unilateral de MK-801, P_4 y VAP en el PnC redujo significativamente la duración y voltaje de las postdescargas inducidas por PTZ.

Peterson (1996) mostró que las microinyecciones bilaterales de VAP en el PnC no bloquearon las crisis inducidas por electrochoque, nuestros hallazgos muestran que la microinyección unilateral de MK-801, P_4 y VAP en el PnC, que es la continuación caudal del PnC bloqueó las CTGC lo que nos podría sugerir que esta estructura puede ser un sitio blanco específico de estos fármacos y que es suficiente para suprimir las CTGC en nuestros estudios. También nos sugiere que el mecanismo de acción podría ser a través del receptor de GABA ya que se ha reportado que el VAP aumenta los niveles de este neurotransmisor. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo podemos deducir que el incremento de los niveles endógenos de GABA en el PnC previnieron la excitación producida por el PTZ. Sin embargo, existe otro mecanismo probable ya que este bloquea los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Ragsdale y Avoli, 1998; Avoli et al, 2001) y como hemos mencionado anteriormente, también la neurotransmisión del receptor a NMDA juega un papel importante en la supresión de las crisis por PTZ.

Los resultados obtenidos con la microinyección de P_4 en el PnC muestran que también este núcleo es un sitio de acción de la P_4 para la regulación de la actividad epiléptica inducida por PTZ. La dosis utilizada se eligió de acuerdo a trabajos previos. Se ha reportado que la P_4 tiene efectos anticonvulsivantes pero se desconoce hasta la fecha su sitio de acción dentro del SNC; además también

se ha demostrado que los productos del metabolismo de la P_4 como la alopregnanolona tienen actividad anticonvulsivante por su unión al receptor de GABA con una potencia mucho mayor que la P_4 .

La metodología utilizada en este trabajo nos permitió demostrar que no todos los fármacos antiepilépticos ejercen su actividad anticonvulsivante a través del PnC, sino que existe la posibilidad que los fármacos que no protegieron contra las crisis por PTZ en el PnC tengan su sitio de acción en otras estructuras dentro del SNC.

Además, también se apoya y aumenta el conocimiento con el cual se demuestra que la aplicación unilateral de anticonvulsivantes es suficiente para controlar la aparición de la actividad epiléptica inducida en varios modelos experimentales de crisis epilépticas, como ya se ha reportado previamente.

Es importante mencionar que la investigación básica con modelos experimentales es un arma muy valiosa para el estudio de los mecanismos por medio de los cuales se puede regular la actividad epiléptica. Este tipo de investigaciones no son posibles en la investigación con seres humanos pero se ha mostrado que de los resultados generados en la investigación básica se derivan las posibles estrategias para abordar los problemas médicos como la epilepsia.

La mayoría de las investigaciones reportan que se reduce o suprime la actividad convulsiva producida por diferentes modelos de epilepsia pero se ha establecido que la mejor manera de demostrar la protección contra las crisis es contando con un registro de la actividad electrográfica cerebral que indique cuales fueron los cambios de la actividad convulsiva provocados por la manipulación experimental. En este reporte se dan evidencias conductuales y electrográficas que se correlacionan con la inhibición de la actividad epiléptica producida por PTZ.

Se ha reportado que las CTCG se pueden bloquear con DFH vía sistémica pero no se sabe en donde es su sitio de acción dentro del SNC, en este trabajo la

microinyección de DFH en el PnC no tuvo efectos sobre las crisis por PTZ por lo que podemos deducir que esta estructura no es un sitio blanco para su efecto anticonvulsivante.

Se ha demostrado que la ETO administrada por vía sistémica es altamente específica contra las crisis por PTZ (Löscher y Schmidt, 1988; De Deyn et al, 1992), en este trabajo encontramos que la microinyección de ETO (aún con las dosis utilizadas en este experimento que son más altas que las utilizadas en reportes previos (Peterson, 1994)), en el PnC no modificó las crisis por lo que podemos suponer que éste no es un sitio de acción de la ETO para regular la aparición de la actividad convulsiva en este modelo.

Se ha reportado que la CBZ y la DFH administrados por vía sistémica no afectan las crisis por PTZ, sin embargo no existen evidencias de su posible actividad anticonvulsiva al ser aplicadas tópicamente en el PnC, en este trabajo encontramos que administrados en el PnC estos fármacos no tuvieron efecto anticonvulsivante, estos resultados no descartan la posibilidad de que pudieran ejercer su actividad anticonvulsiva en sitios diferentes del SNC, por lo que se requieren futuras investigaciones en las que se puedan mapear diferentes estructuras involucradas en la regulación de la actividad epiléptica sobre las que actúen estos fármacos.

Los hallazgos de este trabajo apoyan la posibilidad de que la administración de fármacos con propiedades anticonvulsivantes pueda realizarse por medio de microinyección localizada para poder determinar sitios altamente específicos y selectivos en términos de su función sobre receptores en una región cerebral blanco y de la posibilidad de bloquear la actividad convulsiva inducida con otros modelos experimentales de epilepsia.

A pesar de que se ha reportado que la DFH sistémica redujo el disparo neuronal de las células de la FRP a la par de la inhibición de las crisis audiogénicas (N'Gouemo y Faingold, 2000), si corroboramos los sitios de registro esta actividad se registró en el núcleo gigantocelular que corresponde a la FRB

por lo que los resultados mostrados aquí sugieren que se debe explorar otros sitios dentro de la FR para mapear los efectos diferenciales de cada uno de los fármacos utilizados sobre las CTCG.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

Con base en nuestros resultados podemos concluir que la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria en el PnC juegan un papel importante en la regulación de la actividad epiléptica inducida por PTZ. Derivado de lo anterior podemos sugerir que el PnC es uno de los sitios blanco para algunos fármacos antiepilépticos.

Nuestros datos indican que en el PnC de la rata, los antagonistas no-competitivos del receptor a NMDA como el MK-801, bloquean la generación de los componentes tónicos y clónicos de las crisis generalizadas inducidas por PTZ.

La progesterona en el PnC bloqueó la generación de las crisis inducidas por PTZ, este efecto puede ocurrir por medio de su metabolito reducido que actúa sobre los receptores del GABA_A.

El VAP en el PnC bloqueó las CTCG inducidas por PTZ en forma dependiente de la dosis. Por lo que se debe investigar si este efecto es por el aumento de las concentraciones de GABA o el bloqueo de los canales de sodio en el PnC.

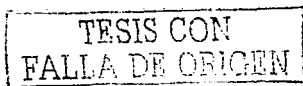
La ETO en el PnC no modificó las CTCG provocadas por PTZ, por lo que podemos suponer que el PnC no es un sitio blanco a través del cual la ETO ejerce su efecto antiepiléptico.

Los fármacos antiepilépticos que protegieron contra las CTCG también provocaron una reducción o inhibición de la actividad conductual y electrográfica inducida por el PTZ.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

- Albright, PS., Bruni, J. 1984. Effects of carbamazepine and its epoxide metabolite on amygdala-kindled seizures in rats. *Neurology* 34:1383-1386.
- Avoli, M. 1991. Excitatory amino acid receptors in the human epileptogenic neocortex. *Epilepsy Research* 10: 33-40.
- Avoli, M., Rogawski, MA., Avanzini, G. 2001. Generalized epileptic disorders: an update. *Epilepsia* 42:4:445-457.
- Bäckström, T., Zetterlund, B., Blom, S., Romano, M. 1984. Effects of continuous progesterone infusion on the epileptic discharge frequency in women with partial epilepsy. *Acta Neurol Scand* 69:240-248.
- Bäckström, T., Rosciszewska, D. 1998. Effects of hormones on seizure expression. En: Engel J Jr., Pedley TA, eds. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. New York: Lippincott-Raven Publishers; 2003-2012.
- Beyenburg, S., Stoffel-Wagner, B., Bauer, J., Watzka, M., Blümcke, I., Bidlingmaier, F., Eiger, CE. 2001. Neuroactive steroids and seizure susceptibility. *Epilepsy Research* 44:141-153.
- Blum, JE., Haefely, W., Jalfre, M., Polc, P., Scharer, K. 1973. Pharmakologie und toxicologie des antiepileptikums clonazepam. *Arzneimittel Forschungen* 23:377-389.
- Bromfield, EB. 1998. Ethosuximide and other succinimides. En: Engel J Jr., Pedley TA, eds. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. New York: Lippincott-Raven Publishers; 1503-1508.
- Browne, TR. 1998. Phenytoin and other hydantoins. In: Engel J Jr., Pedley TA, eds. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. New York: Lippincott-Raven Publishers; 1557-1579.
- Browning, RA., Simonton, RL., Turner, FJ. 1981a. Antagonism of experimentally induced tonic seizures following a lesion in the midbrain tegmentum. *Epilepsia* 22:595-601.
- Browning, RA., Turner, FJ., Simonton, RL., Bundman, MC. 1981b. Effect of midbrain and pontine tegmental lesions on the maximal electroshock seizure pattern in rats. *Epilepsia* 22:583-594.
- Browning, RA. 1985. Role of the Brain-stem reticular formation in tonic-clonic seizures. Lesion and pharmacological studies. *Fed. Proc.* 44:2425-2431.
- Browning, RA., Nelson, DK., Mogharreban, N., Jobe, PC., Laird II, HE. 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 lesions on seizures in experimental animals. In Fromm, GH., Faingold, CL., Browning, RA., Burnham, WM. (eds). *Epilepsy and the reticular Formation: The Role of the Reticular Core in Convulsive Seizures*. Liss. New York, pp 137-162.
- Browning, RA., Wang, C., Nelson, DK., Jobe, PC. 1999. Effect of precollicular transection on audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Experimental Neurology* 155:295-301.



Bustamante, L., Lueders, H., Pippenger, C., Goldesohn, ES. 1980. The effects of phenytoin on the penicillin-induced spike focus. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 48:90-97.

Camacho-Arroyo, I., Tapia, R. 1992. Levels, uptake, and release of glycine and glutamate in the rat pontine reticular formation. *Neurochemical Research* 17:463-467.

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., Olney, JW, Benz, AM., Fuller, TA., Zorumski, CF. 1990. Ketamine, phencyclidine, and MK-801 protect against Kainic Acid-induced seizure-related brain damage. *Epilepsia*. 31:4:382-390.

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.

Croucher, MJ., Collins, JF., Meldrum, BS. 1982. Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. *Science*. V 216:899-901.

Czuczwar, SJ., Patsalos, PN. 2001. The new generation of GABA enhancers. Potential in the treatment of epilepsy. *CNS Drugs*. 15:5:339-50.

David, J., Grewal, RS. 1976. Effect of carbamazepine (Tegretol) on seizure and EEG patterns in monkeys with alumina-induced focal motor and hippocampal foci. *Epilepsia* 17:4 15-422.

De Deyn, PP., Macdonald, RL. 1989. Effects of antiepileptic drugs on GABA responses and on reduction of GABA responses by PTZ and DMCM on mouse neurons in cell culture. *Epilepsia* 30:1:17-25.

De Deyn, PP., D'Hooge, R., Marescau, B., Pei, Y-Q. 1992. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Research* 12:87:87-110.

Deckers, LPC., Czuczwar, SJ., Heckster, YA., Keyser, A., Kubova, H., Meinardi, H., Patsalos, PN., Renier, WO., and Van Rijn, CM. 2000. Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanisms of action: the evidence reviewed. *Epilepsia* 41:1364-1374.

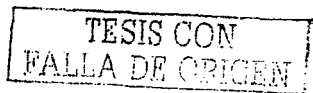
De Lorenzo, RJ. 1984. Calmodulin systems in neuronal excitability: a molecular approach to epilepsy. *Annals of Neurology* 16 (Suppl.) S104-S114.

De Sarro, G., Meldrum, B., Reavill, CH. 1985 Anticonvulsant action of 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid in the substantia nigra. *Eur. J of Pharmacology*. 106:175-179.

Dodson, EW. 1998. Efficacy. In: Engel J Jr., Pedley TA. eds. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. New York: Lippincott-Raven Publishers; 1155-1164.

Dundee, JW., Wyant, GM. 1974. Steroid anaesthetics. In: Dundee, JW., Wyant, GM (eds) *Intravenous anaesthesia*. Edinburgh: Churchill Livingstone, p 193-206.

Eder, HG., Jones, DB., Fisher, RS. 1997. Local perfusion of diazepam attenuates interictal and ictal events in the bicuculline model of epilepsy in rats. *Epilepsia* 38:516-521.



Edmonds, H.L., Stark, L.G., Hollinger, MA. 1974. The effect of diphenylhydantoin, phenobarbital and diazepam on the penicillin-induced focus in the rat. *Experimental Neurology* 45:377-386.

Elazar, Z., Gottefeld, Z. 1975. Effect of drug-induced increase of brain GABA levels on penicillin focus. *Experientia* 31:676-678.

Elazar, Z., Berchanski, A. 2000. Excitatory amino acids modulate epileptogenesis in the brain stem. *Neuroreport* 11, 1777-1780.

Engel, Jerome. 1991. Clinical aspects of epilepsy. *Epilepsy Res* 10:9-17.

Faingold, CL., Naritoku, DK., Copley, CA., Randall, ME., Riaz, A., Anderson, CA., Arneric, SP. 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.

Faingold, CL., Marcinczyk, MJ., Casebeer, DJ., Randall, ME., Arneric, SP., Browning, RA. 1994. GABA in the inferior colliculus plays a critical role in control of audiogenic seizures. *Brain Research* 640:40-47.

Faingold, CL., Randall, ME. 1995. Pontine reticular formation neurons exhibit a premature and precipitous increase in acoustic responses prior to audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Brain Research* 704:218-226.

Faingold, CL. 1998. Locomotor behaviors in generalized convulsions are hierarchically driven from specific brain-stem nuclei in the network subserving audiogenic seizure. *Annals of the New York Academy of Sciences* 860:566-569.

Fariello, RG., Forchetti, CM., and Fisher, RS. 1991. GABAergic function in relation to seizure phenomena. [in] Fisher, RS., Coyle, JT. eds. "Neurotransmitters and Epilepsy". Wiley-Liss, New York. pp 77-93

Fisher, R. 1989. Animal models of the epilepsies. *Brain Res Rev* 14; 245-278.

Fisher, RS. 1991. Clinical overview of Epilepsy. [in] Fisher, RS., Coyle, JT. eds. "Neurotransmitters and epilepsy". Wiley-Liss, Inc. New York. pp 1-16.

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.

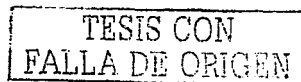
Frey, HH., Loscher, W. 1976. Di-n-propylacetic acid-profile of anticonvulsant activity in mice. *Arzneimittelforschung* 26;2:299-301

Fromm, GH. 1985. Effects of different classes of antiepileptic drugs on brain-stem pathways. *Fed. Proc.* 44:2432-2435.

Fromm, GH., Terrence, CF. 1987. Effect of antiepileptic drugs on the brain-stem. In Fromm, GH., Faingold, CL., Browning, RA., Burnham, WM. (eds), *Epilepsy and the Reticular Formation: The Role of the Reticular Core in Convulsive Seizures* Wiley-Liss, New York, pp 119-136.

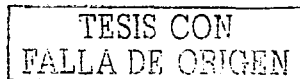


- Gale, K. 1989. GABA in epilepsy: The pharmacologic basis. *Epilepsia* 30(Suppl.3):S1-S11.
- Godin, Y., Heiner, L., Mark, J., Mandel, P. 1969. Effect of dipropylacetate an anticonvulsive compound on GABA metabolism. *Journal of Neurochemistry* 16:869-873.
- Grecksch, G., Becker, A., Matthies, H. 1990. Threshold to elicit seizures by picrotoxin is lowered in pentylenetetrazol-kindled mice. *Neuropharmacology* 29;11:1073-1074.
- Halonen, T., Pitkanen, A., Partanen, J., Hyttinen, JM., Riekkinen, PJ. 1992. Amino acid levels in cerebrospinal fluid of rats after administration of pentylenetetrazol. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C:1:21-25.
- Hashizume, K., Tanaka, T., Fujita, T., Tanaka, S. 2000. Generalized seizures induced by an epileptic focus in the mesencephalic reticular formation: impact on the understanding of the generalizing mechanism. *Stereotact Funct Neurosurg* 74;3-4:153-60.
- Ishimoto, T., Omori, N., Mutoh, F., Chiba, S. 2000. Convulsive seizures induced by N-methyl-D-aspartate microinjection into the mesencephalic reticular formation in rats. *Brain Research* 881:152-158.
- Ito, T., Hori, M., Yoshida, K., Shimizu, M. 1977. Effect of anticonvulsants on cortical focal seizures in cats. *Epilepsia* 18:63-71.
- Julien, RM., Hollister, RP. 1975. Carbamazepine: mechanism of action. In: Penry, JK., Daly, DD (eds) *Advances in Neurology* 11:263-276.
- Klemm, WR. 1990. Historical and introductory perspectives on brainstem-mediated behaviors. In: Klemm, WR., Vertes, RP (eds) *Brainstem mechanisms of behavior*. John Wiley & Sons, New York. p 3-31
- Lai, YY., Wu, J.-P., Kuo, JS., Siegel, JM. 1995. Distribution of NMDA and non-NMDA receptors in the feline pons and medulla. *Soc Neurosci Abstr* 21:838.
- Landgren, S., Bäckström, T., Kalistratov, G. 1978. The effect of progesterone on the spontaneous interictal spike evoked by topical application of penicillin to the cat's cerebral cortex. *J Neurol Sci* 36:119-133.
- Landgren, S., Aasly, J., Bäckström, T., Dubrovsky, B., Danielsson, E. 1987. The effect of progesterone and its metabolites on the interictal epileptiform discharge in the cat's cortex. *Acta Physiol Scand* 131:33-42.
- Leite, JP., Bortolotto, ZA., Cavaleiro, EA. 1990. Bilateral microinjection of ethosuccimide into the substantia nigra does not prevent amygdala-kindled seizures. *Braz J Med Biol Res* 23;11:1139-41.
- Leviel, V., Naquet, R. 1977. A study of the action of valproic acid on the kindling effect. *Epilepsia* 18:229.
- Loscher, WL., Schmidt, D. 1988. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drug? A proposal based in experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res* 2:145-181.



- Löscher, W., Honack, D., Fassbender, CP., Nolting, B. 1991. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylenetetrazol seizure models. *Epilepsy Research* 8:171-189.
- Löscher, W. 1993. Basic aspects of epilepsy. *Curr Opin Neurol Neurosurg*, 6;2:223-32.
- Louis, S., Kutt, H., McDowell, F. 1968. Intravenous diphenylhydantoin in experimental seizures.II. Effect on penicillin-induced seizures in the cat. *Archives of Neurology* 18:472-477.
- Macdonald, RL., Bergey, GK. 1979. Valproic acid augments GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurons. *Brain Research* 170:538-562
- 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.
- Majewska, MD. 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA-A receptor: mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol* 38:379-395.
- Majkowski, J., Sobieszek, A., Bilinska, NB., Karlinski, A. 1976. EEG and clinical studies of the development of alumina cream epileptic foci in split brain cats. *Epilepsia* 17:257-269.
- Marangos, P.J., Post, RM., Patel, J., Zander, K., Parma, A., Weiss, S. 1983. Specific and potent interactions of carbamazepine with brain adenosine receptors. *European Journal of Pharmacology* 93:175-182.
- Mares, P. 1998. Ontogeny of ethosuximide action against two seizure models in rats is diferent. *Pharmacology letters* 63:51-57.
- Mattson, RH. 1998. Efficacy. In: Engel J Jr., Pedley TA. eds. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. New York: Lippincott-Raven Publishers; 1491-1502.
- Meldrum, BS., Horton, RW., Toseland, PA. 1975. A primate model for testing anticonvulsant drugs. *Archives of Neurology* 32:289-294.
- Meldrum, BS. 1996. Update on the mechanism of action of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 37 (Suppl 6):S4-S11.
- Meldrum, BS. 1998. The glutamate synapse as a therapeutical target: perspectives for the future. *Prog Brain Res* 79:441-458.
- Meldrum, BS., Chapman, AG. 1999. Excitatory amino acid receptors and antiepileptic drug development. *Adv Neurol* 79:965-978.
- Merrit, HH., Putnam, TJ. 1938. A new series of anticonvulsant drugs tested by experiments on animals. *Arch Neurol Psychiatry* 39:1003-1015.
- Mintz, M., Rose, IC., 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. Selective metabolic activation of the mammillary bodies and their connections during ethosuximide-induced suppression of pentylenetetrazol seizures. *Epilepsia* 27:194-203.

- 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.
- Mohammad, S., Abolhassan, A., Pourgholami, MH. 1998. Evaluation of the anticonvulsant profile of progesterone in male amygdala-kindled rats. *Epilepsy Research* 30:195-202.
- Mok, WM., Krieger, NR. 1991. Synthesis of a (1,2-3H)-labeled pregnanolone. *Steroids* 56:544-548.
- Mori, A. 1974. Neuropharmacologic studies on anticonvulsants. *Brain Development* 6:435-440.
- Morimoto, K., Katayama, K., Inoue, K., Sato, K. 1991. Effects of competitive and noncompetitive NMDA receptor antagonists on kindling and LTP. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 40:893-899.
- N'Gouemo, P., Faingold, CL. 2000. Phenytoin administration reveals a differential role of pontine reticular formation and periaqueductal gray neurons in generation of the convulsive behavior and audiogenic seizures. *Brain Research* 24;859:311-317.
- Norberg, L., Wahlström, G., Bäckström, T. 1987. The anaesthetic potency of 3-hidroxy-5pregnan-20-one and 3-hydroxy-5pregnan-20-one determined with an intravenous EEG-threshold method in male rats. *Acta Pharmacol Toxicol Scand* 61:42-47.
- Olsen, RW., Avoli, M. 1997. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia* 38:399-407.
- Olsen, RW., DeLorey, TM. 1999. GABA and glycine. [in] Siegel, G.J., Agranoff, BW., Albers RW., Fisher, SK., Usher, MD. Eds. "Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects". Lippincot-Raven. Philadelphia. 336-346.
- Palmer, GC., Harris, EW., Ray, R., Stagnitto, ML., Schmiesing, RJ. 1992. Classification of compounds for prevention of NMDLA-induced seizures/mortality, or maximal electroshock and pentylenetetrazol seizures in mice and antagonism of MK-801 binding *in vitro*. *Arch. Int. Pharmacodyn* 317:16-34.
- Patry, G., Naquet, R. 1971. Action de l'acide dipropylacetique chez le Papio papio photosensible. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 49:568-572.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Australia.
- Pellmar, T., Wilson, V. 1977. Synaptic mechanisms of pentylenetetrazole: selectivity for chloride conductance. *Science* 197:912-914.
- Penfield, W., and Jasper, H. 1954. *Epilepsy and the Functional Anatomy of the Human Brain*, Little, Brown, Boston.
- Peterson, S.L., 1994. Localization of an anatomic substrate for the anticonvulsant activity induced by D-cycloserine. *Epilepsia* 35:933-938.
- Peterson, SL. 1996. The effect on maximal electroshock seizures induced by GABA agents and antiepileptic drugs microinfused into the nucleus reticularis pontis oralis. *Epilepsy Research* 25:161-167.



- Petralia, RS., Yokotani, N., Wenthold, RJ. 1994. Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit, NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J. Neuroscience* 14:667-696.
- Pincus, JH., Lee, SH. 1973. Diphenylhydantoin and calcium. Relation to norepinephrine release from brain slices. *Archives of Neurology* 29:239-244.
- Pinel, JP., Cheung, KF. 1977. Controlled demonstration of metrazol kindling. *Pharmacol. Biochem. Behav* 6:599-600.
- Piredda, 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.
- Prichard, J. 1971. Pentylenetetrazol-induced increase in chloride permeability of leech neurons. *Brain Res* 27:414-417.
- Ragsdale, DS., Avoli, M. 1998. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain Res Revs* 26:16-28.
- Ramanjaneyulu, 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.
- Riaz, A., Faingold, CL. 1994. Seizures during ethanol withdrawal are blocked by focal microinjection of excitant amino acid antagonists into inferior colliculus and pontine reticular formation. *Alcohol Clin Exp Res* 18:6:1456-1462.
- Richards, RK., Everett, GM. 1944. Analgesic and anticonvulsive properties of 3,5,5-trimethyloxazolidine-2,4-dione (Tridione). *Fed Proc* 3:39.
- Rogawski, MA. 1992. The NMDA receptor, NMDA antagonists and epilepsy therapy: A status report. *Drugs* 44:3:279-292.
- Rowan, JA. 1998. Valproate. In: Engel J Jr., Pedley TA, eds. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. New York: Lippincott-Raven Publishers: 1599-1607.
- Saad, SF., El Masry, AM., Scott, PM. 1972. Influence of certain anticonvulsants on the concentration of γ -aminobutyric acid in the cerebral hemispheres of mice. *European Journal of Pharmacology* 17:386-392.
- Salt, TE., Tulloch, IF., Walter DS. 1980. Antiepileptic properties of sodium valproate in rat amygdaloid kindling. *British Journal of Pharmacology* 68:134P.
- Schunzel, G., Wolf G, Pomrenke U., Pomrenke C., Schmidt W. 1992. Pentylenetetrazol kindling and factors of glutamate transmitter metabolism in rat hippocampus. *Neuroscience* 49:2:365-371.
- Shenoy, AK., Miyahara, JT., Swinyard, EA., Kupferberg, HJ. 1982. Comparative anticonvulsant activity and neurotoxicity of clobazam, diazepam, phenobarbital, and valproate in mice and rats. *Epilepsia* 23:399.
- Shimoji, K., Fujioka, H., Fukazawa, T., Hashiba, M., and Maruyama, I. 1984. Anesthetics and excitatory/inhibitory responses of midbrain reticular neurons. *Anesthesiology* 61:151-155.

Simler, S., Ciesielski, L., Maitre, M., Randrian, H., Mandel, P. 1973. Effect of sodium-n-dipropylacetate on audiogenic seizures and brain γ -aminobutyric acid. *Biochemical Pharmacology* 22:1701-1708.

Simon, D., Penry, JK. 1975. Sodium di-N-propylacetate (DPA) in the treatment of epilepsy. A review. *Epilepsia* 16:4:549-73.

Skerritt, JH., Johnston, GAR., Chen, CS. 1983b. Interactions of carbamazepine with benzodiazepine receptors. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 35:464-468.

Sparenborg, S., Brønnecke, 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., Caspers, H. 1973. Paroxysmal depolarization and changes in action potentials induced by pentylenetetrazol in isolated neurons of *Helix pomatia*. *Epilepsia* 14:397-408.

Spero, L. 1982. Neurotransmitters and CNS disease. *Epilepsy. Lancet* 2:1319-1322.

Spero, L. 1985. Specific binding of (3 H-) phenytoin in the human brain. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 63:517-518.

Stafstrom, CE., Holmes, GL., Thompson, JL. 1993. MK-801 pretreatment reduces kainic acid-induced spontaneous seizures in prepubescent rats. *Epilepsy Research* 14:41-48.

Stringer, JL. 1996. Ethosuximide specifically antagonizes the effect of pentylenetetrazol in the rat entorhinal cortex. *Epilepsy Research* 25:69-77.

Temkin, NR., Jarell, AD., Anderson, GD. 2001. Antiepileptogenic agents: How close are we?. *Drugs* 61:8:1045-1055.

Theobald, W., Kunz, HA. 1963. Zur pharmakologie des antiepileptikums 5-carbamyl-5H-dibenzo (b,f) azepine. *Arzneimittel Forschungen* 13:122-125.

Turski, L., Andrews, JS., Loschmann, PA., Bressler, K., Bortolotto, ZA., Calderazzo-Filho, LS., Cavalehiro, EA. 1990. Substantia nigra regulates action of antiepileptic drugs. *Brain Res* 18:520 (1-2):232-9.

van Duijn, H., Beckman, MK. 1975. Dipropylacetic acid (Depakine) in experimental epilepsy in the alert cat. *Epilepsia* 16:83-90.

Velasco, F., Velasco, M., Estrada-Villanueva, F., Machado JP. 1975. Specific and nonspecific multiple unit activities during the onset of pentylenetetrazol seizures. I. Intact animals. *Epilepsia* 16:207-214.

Velasco, F., Velasco, M., Romo, R. 1982. Specific and non-specific multiple unit activities during pentilentetrazol seizures in animals with mesencephalic transections. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 53:289.

Velasco, F., Velasco, M., Romo, R. 1983. Push-pull perfusion of pentilentetrazol in the brain stem of "encephale isole" cats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 56:521.

Vellsek, L., Veresova, S., Pobisova, H., Mares, P. 1991. Excitatory amino acid antagonists and pentylenetetrazol-induced seizures during ontogenesis. II.: The effects of MK-801. *Psychopharmacology* 104:510-514.

Vernadakis, A., Woodbury, DM. 1960. Effect of diphenylhydantoin and adrenocortical steroids on free glutamic acid, glutamine and gamma-aminobutyric acid concentrations of rat cerebral cortex. In: Roberts, E., Barden, CF., Van Harreveld A., Wiersma, CAG., Adey, WR., Killam, KF (eds) *Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid*. Pergamon, New York, p 242-248.

Wada, JA., Sato, M., Wake, A., Green, JR., Troupin, AS. 1976. Prophylactic effect of phenytoin, phenobarbital, and carbamazepine examined in kindling cat preparations. *Archives of Neurology* 33:426-434.

Wada, JA. 1977. Pharmacological prophylaxis in the kindling model of epilepsy. *Archives of Neurology* 34:389-395.

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.

Watkins, JC., Krogsgaard-Larsen, P., Honoré, T. 1990. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends in Pharmacol. Sci.* 11:25-33.

Weinberger, J., Niklas, WL., Berl, S. 1976. Mechanism of action of anticonvulsants. Role of the differential effects on the active uptake of putative neurotransmitters. *Neurology* 26:162-166.

Differential effects of NMDA antagonists microinjections into the nucleus reticularis pontis caudalis on seizures induced by pentylenetetrazol in the rat

Joaquín Manjarrez ^a, Raúl Alvarado ^a, Ignacio Camacho-Arroyo ^{b,*}

^a Unidad de Investigaciones Cerebrales, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS, México, D.F. México

^b Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México

Received 4 December 2000; received in revised form 31 January 2001; accepted 6 February 2001

Abstract

It has been shown that NMDA antagonists block the tonic but not the clonic component of seizures when they are injected in the oral region of the rat pontine reticular formation (PRF). The participation of the caudal PRF in the effects of NMDA antagonists upon the tonic and the clonic components of generalized seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) is unknown. The aim of the present study was to evaluate the effects of unilateral microinjections of competitive and non-competitive NMDA antagonists, 2-amino-7-phosphoheptanoic acid (AP-7) and dizocilpine (MK-801), respectively, into the nucleus reticularis pontis caudalis of the rat PRF upon seizures induced by PTZ (70 mg/kg i.p.). MK-801 induced a dose-related decrease both in the incidence of generalized tonic-clonic seizures (GTCS) and in the presence of spikes in the EEG. MK-801 also increased GTCS latency. On the contrary, AP-7 did not have effects on GTCS. Interestingly, it induced ipsilateral circling behavior. These results suggest that in the caudal region of the rat PRF only non-competitive NMDA antagonists should block the generation of tonic and clonic components of generalized seizures. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Pontine reticular formation; NMDA antagonists; MK-801; AP-7; Pentylenetetrazol

1. Introduction

Several reports have demonstrated that the pontine reticular formation (PRF) participates in

the generation and maintenance of epileptic states (Browning, 1987; Faingold, 1987). Electrolytic and mechanical lesions of the oral PRF, specifically the nucleus reticularis pontis oralis (PnO), suppress the tonic hindlimb extension induced by audiogenic seizures or maximal electroshock without affecting the clonic component of seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) or minimal electroshock (Browning et al., 1985; Browning, 1987; Applegate et al., 1991).

* Corresponding author. Present address: Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F. México. Tel.: +525-6223098; fax: +525-6162010.

E-mail address: igcar@servidor.unam.mx (I. Camacho-Arroyo).

Glutamate and aspartate, which are clearly involved in epilepsy (Croucher et al., 1982; Avoli and Olivier, 1987), are highly concentrated in the rat PRF (Camacho-Arroyo and Tapia, 1992). Their effects are mediated by several receptor subtypes but in fact the *N*-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor has been the most studied of them. NMDA receptors have been located in the PRF (Wenzel et al., 1996; Daggett et al., 1998) and their participation in seizures has been clearly documented (Mintz et al., 1990; Faingold et al., 1993; Chapman, 1998).

It has been reported that the administration of both the competitive NMDA antagonist 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid (AP-7) and the non-competitive antagonist dizocilpine (MK-801) into the PnO inhibited the tonic hindlimb extension induced by maximal electroshock (Peterson, 1995). The administration of MK-801 and the competitive NMDA antagonist 3-(\pm)-2-carboxypiperazin-4-yl-propyl-1-phosphonic acid (CPP) into the PnO also blocked audiogenic seizures during ethanol withdrawal (Riaz and Faingold, 1994). Microinfusions of D-cycloserine, a partial agonist of the strychnine-insensitive glycine site of NMDA receptor, into the PnO also blocked the tonic component of seizures induced by maximal electroshock (Peterson, 1994). A recent report shows that microinjections of glutamate into the oral PRF potentiate the convulsive effects of carbachol, and that this potentiation is diminished by MK-801 (Elazar and Berchanski, 2000).

In contrast to the number of evidences about the role of NMDA receptors in oral PRF in relation to epilepsy, the participation of NMDA receptors in the caudal PRF, specifically the nucleus reticularis pontis caudalis (PnC) in the generation and maintenance of seizures has only been studied in a genetic model of audiogenic seizures that produce tonic hindlimb extension (Faingold et al., 1992). In that report the administration of MK-801 into the PnC attenuated audiogenic seizures. The aim of this study was to evaluate the effects of unilateral microinjections of competitive and non-competitive NMDA antagonists, AP-7 and MK-801, respectively, into the rat PnC upon tonic clonic seizures induced by PTZ.

2. Methods

Adult male Wistar rats (270–300 g) maintained under a 12:12 h light:dark cycle, lights on from 07:00 to 19:00, with food and water available ad libitum were used. Electrodes and cannula were surgically implanted in all rats under sodium pentobarbital (65 mg/kg i.p.) anesthesia. Stainless-steel electrodes were implanted in the motor cortex for electroencephalographic (EEG) recording. Besides, a stainless-steel guide cannula (25-gauge) was unilaterally implanted into the PnC 4 mm above the injection site (AP: -9.8, L: 1.0, V: 8.5) (Paxinos and Watson, 1998). A stylet was placed in the guide cannula to prevent clogging when not in use. Anchor screws were set in the skull, and the assembly was secured with dental cement. After surgery the animals were allowed a week to recover in their home-cage.

In order to observe ictal behavior animals were placed in plexiglass arena (30 × 30 × 30 cm) the day of the experiment. Awake free-moving rats were connected by a flexible insulated cable to a Grass 78D polygraph and a control EEG recording was carried out for 15 min. Then, rats (eight per group) were unilaterally injected with MK-801 (RBI, 6–24 nmol), AP7 (RBI, 9 and 18 nmol) or vehicle (PBS, pH 7.4) in a total volume of 0.2 μ l during 1 min using an injection needle (32-gauge) inserted into the guide cannula connected through a polyethylene tube to a 5 μ l Hamilton syringe. Cannula was maintained in the injection site for 3 more minutes after the injection. Immediately after each injection (at 08:00 h), EEG and animals behavior were recorded, and 30 min later animals were injected with PTZ (Sigma, 70 mg/kg i.p.). The recording continued for 120 min. Although bilateral microinjections of NMDA antagonists have been used in many studies, we performed unilateral microinjections into the PnC since at the beginning of our study we obtained very similar results between unilateral and bilateral microinjections of MK-801 (6 nmol). Besides, several reports have indicated that unilateral microinjections of several drugs into the brainstem are effective in the attenuation or inhibition of tonic components of seizures induced by different procedures (Shehab et al., 1995, 1997; Walker et al., 1999).

At the end of the recording, pontamine blue (Sigma) (1.2 µg/0.2 µl) was injected in order to localize the injection site. Animals were then i.p. injected with an overdose of sodium pentobarbital and transcardially perfused with saline and 3.7% formalin. Brains were removed and postfixed in 3.7% formalin. The injection sites were verified in 60 µm coronal slices stained with cresyl violet by using the atlas of Paxinos and Watson (1998). Each animal was only used once, and the experiments were performed under the guidelines of the Mexican Law of Animal Protection.

Behavioral response of the animals to PTZ administration, latency to the first generalized tonic clonic seizures (GTCS), incidence of GTCS, survival percentage, and postdischarges characteristics in the EEG were evaluated. PTZ seizures were characterized by facial twitches and bilateral forelimb myoclonus, and GTCS with wild running and tonic hindlimb extension (Fisher, 1989). Fisher's exact probability test as well as analysis of variance followed by Tukey's test were used for statistical evaluation. Probability values were calculated by using the Prism 2.01 program (Graph Pad, CA).

3. Results

All animals treated with vehicle and 30 min later with PTZ presented GTCS. MK-801 microinjections into the PnC induced a dose-related decrease in GTCS induced by PTZ. Only 37.5% of the rats injected with MK-801 (6 nmol/0.2 µl) presented GTCS, and no rats with MK-801 (12 and 24 nmol/0.2 µl) had GTCS (Table 1). Animals injected with 12 and 24 nmol of MK-801 only presented facial and forelimb myoclonus. The latency to the first GTCS in the animals injected with the lowest dose of MK-801 (6 nmol/0.2 µl) was higher than that observed in the animals treated with vehicle (Table 2). Electrographic recordings from the motor cortex showed that MK-801 markedly reduced ictal events induced by PTZ (Fig. 1). Thus, fewer spikes were observed in rats microinjected with MK-801 compared to those observed in animals microinjected with vehicle after PTZ microinjection. Duration,

Table 1
Effects of MK-801 and AP-7 microinjections into the PnC on GTCS induced by PTZ^a

Treatment	# of animals with GTCS	% of protection
Vehicle (PBS)	8/8	0
AP-7		
9 nmol	8/8	0
18 nmol	8/8	0
MK-801		
6 nmol	3/8	62.5 ^b
12 nmol	0/8	100 ^c
24 nmol	0/8	100 ^c

^a All drugs were microinjected in a volume of 0.2 µl into the rat PnC. Animals were injected with PTZ (70 mg/kg i.p.) 30 min later.

^b $P < 0.05$.

^c $P < 0.01$ as compared with vehicle (Fisher's exact probability test).

amplitude and frequency of postdischarges were lower in the animals microinjected with MK-801 than in those microinjected with vehicle (Fig. 1). Rats survival was also increased by MK-801 microinjections into the PnC (Table 3).

In contrast, AP-7 (9 and 18 nmol/0.2 µl) microinjections into the PnC did not exert a protective role against GTCS induced by PTZ (Tables 1–3). Although the latency to the first GTCS was higher in the animals treated with AP-7 in comparison to that observed in the rats treated with

Table 2
Effects of MK-801 and AP-7 microinjections into the PnC on the latency to the first GTCS induced by PTZ^a

Treatment	Latency (min)
Vehicle (PBS)	1.9 ± 0.5
AP-7	
9 nmol	6.6 ± 3.6
18 nmol	2.4 ± 0.5
MK-801	
6 nmol	8.7 ± 3.5 ^b
12 nmol	no GTCS
24 nmol	no GTCS

^a All drugs were microinjected in a volume of 0.2 µl into the rat PnC. Latency values are mean ± SEM ($n = 8$).

^b $P < 0.05$ as compared with vehicle (Tukey's test).

61

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

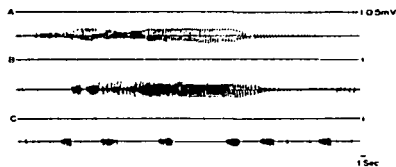


Fig. 1. EEG recording of the effect of NMDA antagonists microinjections into the PnC on GTCS induced by PTZ. The motor cortex was recorded before and after the administration of PTZ (70 mg/kg i.p.) in rats previously (30 min) injected with: (A) 0.2 μ l of vehicle (PBS); (B) AP-7 (9 nmol); and (C) MK-801 (6 nmol) into the PnC.

vehicle, this difference was not statistically significant (Table 2). Interestingly, AP-7 immediately induced ipsilateral circling behavior in relation to the injection site in all studied rats. This behavior lasted all the recording time. Circling behavior was increased with the highest dose (18 nmol/0.2 μ l) of AP-7. The increase in circling behavior made very difficult both the recording and the handling of the animals. All animals injected with this dose of AP-7 presented GTCS (Table 1). Neither circling behavior nor ataxia were ob-

Table 3
Effects of MK-801 and AP-7 microinjections into the PnC on rats survival after GTCS induced by PTZ^a

Treatment	# of surviving animals	% of survival
Vehicle (PBS)	3/8	37.5
AP-7		
9 nmol	2/8	25.0
18 nmol	3/8	37.5
MK-801		
6 nmol	7/8	87.5 ^b
12 nmol	8/8	100 ^b
24 nmol	8/8	100 ^b

^a All drugs were microinjected in a volume of 0.2 μ l into the rat PnC.

^b $P < 0.05$.

^c $P < 0.01$ as compared with vehicle (Fisher's exact probability test).

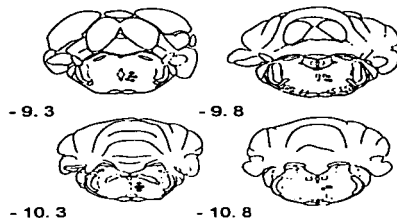


Fig. 2. Location of MK-801 unilateral microinjection sites in the rat PnC. Schemes and coordinates were taken from the Atlas of Paxinos and Watson (1998). (C) vehicle; (●) 6, (■) 12, and (●) 24 nmol/0.2 μ l of MK-801. Two injection sites were located in each marked site. All sites corresponded to the PnC.

served after vehicle or MK-801 microinjections during the recording period.

All microinjections of NMDA antagonists included in our study were localized in the PnC (Fig. 2) (Paxinos and Watson, 1998). MK-801 microinjections ($n = 6$) that missed the PnC (located in the dorsal medial tegmental nucleus) had no effects on PTZ seizures.

4. Discussion

Our results demonstrate that the unilateral microinjection of MK-801, a non-competitive NMDA antagonist, into the PnC reduces in a dose-related manner GTCS induced by PTZ. Interestingly, a competitive NMDA antagonist, AP-7, did not exert anticonvulsant effects.

It has been reported that excitatory aminoacids in the PnC participate in the regulation of acoustic startle response (Krause et al., 1993; Misserendino and Davis, 1993) and in the presentation of tonic hindlimb extension observed during audiogenic seizures in rats (Faingold et al., 1992). In this report we show that excitatory neurotransmission mediated by NMDA receptors in PnC is also involved in the generation of clonic compo-

nents of generalized seizures induced by PTZ, which is a very useful model for testing drugs against generalized absence seizures in humans (Löscher and Schmidt, 1988; De Deyn et al., 1992).

Although it has been proposed that caudal structures of the brainstem are only involved in the generation of tonic components of seizures (Browning, 1987; Burnham, 1987; Faingold and Caspary, 1987), our results suggest that PnC should also participate in the manifestation of the clonic ones since both the behavioral and the electrographic components of tonic-clonic seizures induced by PTZ, which have been associated to forebrain structures (Gale and Browning, 1988), were inhibited by MK-801 microinjections into the PnC. It is possible that the neural circuitry involved in the regulation of tonic and clonic components of seizures at PnC level are different.

The possibility that the effects of AP-7 and MK-801 in PnC are specific to this region is high since microinjections located in the dorsal medial tegmental nucleus had no effects on GTCS induced by PTZ.

We found a marked difference between MK-801 and AP-7 effects upon seizures induced by PTZ. The former presented clear anticonvulsant properties, whereas the latter not only lacked anticonvulsant effects but also induced circling. This marked difference in the effects of competitive (AP-7) and non-competitive (MK-801) NMDA antagonists on brain excitability has yet been observed. The systemic administration of MK-801 protected rats against seizures induced by hyperbaric oxygen, whereas AP-7 did not exert any effect on these seizures (Chavko et al., 1998). In contrast, it has been reported that the bilateral administration of AP-7 in the inferior colliculus and in PnC is more effective than that of MK-801 in reducing audiogenic seizures (Faingold et al., 1992). It has also been reported that the systemic administration of AP-7 reduced the inferior colliculus neuronal firing, whereas that of MK-801 had no effects (Faingold et al., 1993).

Although the molecular mechanisms involved in the differential effects of MK-801 and AP-7 on seizures are unknown, they may reflect binding

differences between these antagonists in PnC. It has also been hypothesized that differences in NMDA receptor function may reflect an heterogeneity of NMDA receptor distribution in PnC (Faingold et al., 1993). It has also been shown that non-competitive NMDA antagonists increase cerebral metabolism and cerebral blood flow (Roussel et al., 1992), whereas competitive antagonists have the opposite effects (Clow et al., 1991). The mechanisms involved in the induction of circling behavior by AP-7 require further research.

In conclusion, our data indicate that non-competitive NMDA antagonists such as MK-801 in the rat PnC block the generation of tonic and clonic components of generalized seizures induced by PTZ.

Acknowledgements

We thank Flora Garcia-Formenti from CELE, Universidad Nacional Autónoma de México for the revision of the English manuscript and Enrique López Labastida for his help in the design of figures.

References

- Applegate, C.D., Samoriski, G.M., Burchfiel, J.L., 1991. Evidence for the interaction of brainstem systems mediating seizure expression in kindling and electroconvulsive shock seizure models. *Epilepsy Res.* 10, 142–147.
- Avoli, M., Olivier, A., 1987. Bursting in human epileptogenic neocortex is depressed by an *N*-Methyl-D-Aspartate antagonist. *Neurosci. Lett.* 76, 249–254.
- Browning, R.A., Nelson, D.K., Singhareban, N., Jobe, P.C., Lord, H.H.E., 1985. Effect of midbrain and pontine tegmental lesions on audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia* 26, 175–183.
- Browning, R.A., 1987. Effect of lesion on seizures in experimental animals. In: Froome, G.H., Faingold, C.L., Browning, R.A., Burnham, W.M. (Eds.), *Epilepsy and the Reticular Formation*. Alan R. Liss, New York, pp. 137–162.
- Burnham, W.M., 1987. Electrical stimulation studies: generalized convulsions triggered from the brain-stem. In: Froome, G.H., Faingold, C.L., Browning, R.A., Burnham, W.M. (Eds.), *Epilepsy and the Reticular Formation*. Alan R. Liss, New York, pp. 25–38.

- Carnacho-Arroyo, I., Tapia, R., 1992. Levels, uptake and release of glycine and glutamate in the rat pontine reticular formation. *Neurochem. Res.* 17, 463–467.
- Chapman, A.C., 1998. Glutamate receptors in epilepsy. *Progr. Brain Res.* 116, 371–383.
- Chavko, M., Braisted, J.C., Harbin, A.L., 1998. Effect of MK-801 on seizures induced by exposure to hyperbaric oxygen: Comparison with AP-7. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 222–228.
- Cloze, D.W., Lee, S.J., Hammer, R.P., 1991. Competitive (AP7) and non-competitive (MK-801) NMDA receptor antagonists differentially alter glucose utilization in rat cortex. *Synapse* 7, 260–268.
- Croucher, M.J., Collins, J.F., Meldrum, B.S., 1982. Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. *Science* 216, 899–901.
- Daggett, L.P., Johnson, E.C., Varney, M.A., Lin, F.F., Hess, S.D., Deal, C.R., Jaech, C., Lu, C.C., Kerner, J., Landwehrmeyer, G.B., Standaert, D.G., Young, A.H., Harpold, M.M., Velosceli, G., 1998. The human N-Methyl-D-aspartate receptor 2C subunit: genomic analysis, distribution in human brain, and functional expression. *J. Neurochem.* 71, 1953–1968.
- De Deyn, P.P., D'hooge, R., Mareaux, B., Pei, Y.G., 1992. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 12, 87–110.
- Elazar, Z., Berchanski, A., 2000. Excitatory amino acids modulate epileptogenesis in the brain stem. *Neuroreport* 11, 1777–1780.
- Fangold, C.L., 1987. The role of the brain stem in generalized epileptic seizures. *Metab. Brain Dis.* 2, 81–111.
- Fangold, C.L., Caspari, D.M., 1987. Effect of convulsant drugs on the brain stem. In: *Frohm, G.H., Fangold, C.L., Browning, R.A., Burnham, W.M. (Eds.), Epilepsy and the Reticular Formation*. Alan R. Liss, New York, pp. 39–80.
- Fangold, C.L., Naritoku, D.K., Copley, C.A., Randall, M.E., Riaz, A., Boersma, C.A., Arneric, S.P., 1992. Glutamate in the inferior colliculus plays a critical role in audiogenic seizure initiation. *Epilepsy Res.* 13, 95–105.
- Fangold, C.L., Randall, M.E., Naritoku, D.K., Boersma Anderson, C.A., 1993. Non-competitive and competitive NMDA antagonists exert anticonvulsant effects by actions on different sites within the neuronal network for audiogenic seizures. *Exp. Neurol.* 119, 208–204.
- Fisher, R.S., 1989. Animal models of the epilepsies. *Brain Res. Rev.* 14, 245–278.
- Gale, K., Browning, R.A., 1988. Anatomical and neurochemical substrates of clonic and tonic seizures. In: *Dichter, M.A. (Ed.), Mechanisms of Epileptogenesis: The Transition to Seizure*. Plenum Press, New York, pp. 111–152.
- Krause, W., Koch, M., Schnitzler, H.U., 1993. Glutamate antagonists in the reticular formation reduce the acoustic startle response. *Neuroreport* 4, 13–16.
- Löschner, 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.
- Mintz, M., Rose, T.C., Heiberg, L.J., 1990. The effect of the NMDA receptor antagonist, MK-801, on the course and outcome of kindling. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 35, 815–821.
- Misserenden, M.J., Davis, M., 1993. NMDA and non-NMDA antagonists infused into the nucleus reticularis pontis caudalis depress the acoustic startle reflex. *Brain Res.* 623, 215–222.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Australia.
- Peterson, S.L., 1994. Localization of an anatomic substrate for the anticonvulsant activity induced by *D*-cycloserine. *Epilepsia* 35, 933–938.
- Peterson, S.L., 1995. Infusion of NMDA antagonists into the nucleus reticularis pontis oralis inhibits the maximal electroshock seizure response. *Brain Res.* 702, 101–109.
- Riaz, A., Fangold, C.L., 1994. Seizures during ethanol withdrawal are blocked by focal microinjection of excitant amino acid antagonists into the inferior colliculus and pontine reticular formation. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 18, 1456–1462.
- Roussel, S., Pinard, E., Seylaz, J., 1992. The acute effects of MK-801 on cerebral blood flow and tissue partial pressures of oxygen and carbon dioxide in conscious and alpha-chloralose anesthetized rats. *Neuroscience* 47, 959–965.
- Shehab, S., Simkins, M., Dean, P., Redgrave, P., 1995. The dorsal midbrain anticonvulsant zone I: Effects of locally administered excitatory amino acids or bicuculline on maximal electroshock seizures. *Neuroscience* 65, 671–679.
- Shehab, S., Guadagno, J., Ferguson, K., Redgrave, P., 1997. Regional distribution of the anticonvulsant and behavioural effects of bicuculline injected into the pontine reticular formation of rats. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1875–1884.
- Walker, B.R., Easton, A., Gale, K., 1999. Regulation of limbic motor seizures by GABA and glutamate transmission in nucleus tractus solitarius. *Epilepsia* 40, 1051–1057.
- Wenzel, A., Villa, M., Möhler, H., Henke, D., 1996. Developmental and regional expression of NMDA receptor subtypes containing the NR2D subunit in rat brain. *J. Neurochem.* 66, 1240–1248.

64

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN