

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

214

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA MICROINYECCION INTRANIGRAL DE DIAZEPAM EN UN MODELO DE CRISIS GENERALIZADA PRODUCIDA POR METRAZOL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO PRESENTA:

JOSE TRINIDAD VIVAS CORTES

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAUL ALVARADO CALVILLO



2003



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE GUATEMALA

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: **EFFECTO DE LA MICROINYECCION
INTRANIGRAL DE DIAZEPAM EN UN MODELO DE CRISIS GENERALIZADA PRODUCIDA
POR METRAZOL**

realizado por **VIVAS CORTES JOSE TRINIDAD**

con número de cuenta **8233567-4** , quién cubrió los créditos de la carrera de **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DR. RAUL ALVARADO CALVILLO

Propietario

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

Propietario

DRA. MA. LUISA FANJUL PEÑA

Suplente

DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA

Suplente

DR. FRANCISCO JAVIER CAMACHO ARROYO

Consejo Departamental de BIOLOGIA

M. en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ

R. Alvarado
I. Camacho
M. L. Fanjul

C. H. Guerra
F. J. Camacho

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

B

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA.

**EFFECTO DE LA MICROINYECCION INTRANIGRAL DE DIAZEPAM EN UN
MODELO DE CRISIS GENERALIZADA PRODUCIDA POR METRAZOL.**

VIVAS CORTES JOSE TRINIDAD.

Director de Tesis: Dr. RAUL ALVARADO CALVILLO.

Agradecimientos

Deseo expresar mis agradecimientos a las personas que ayudaron a la realización de esta tesis, a mis sinodales por sus valiosos comentarios y críticas.

Al personal del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, en especial al técnico del laboratorio de Fisiología de la Formación Reticular de la Unidad de Investigaciones Cerebrales: Biol. Joaquín Manjarrez, quién con su ayuda y comentarios fue posible. Al Dr. Raúl Alvarado Calvillo, por su ayuda, críticas y comentarios, además de su paciencia.

A todos aquellos que he omitido gracias por su ayuda y amistad.

Dedicó este trabajo a todos mis amigos

A la memoria de mi padre,

a mi familia:

mi madre,

hermanos

**y en especial a mis sobrinas: Elizabeth y Anahí con
quienes he disfrutado de buenos ratos.**

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Fisiología de la Formación Reticular, de la Unidad de Investigaciones Cerebrales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, S.S.

1. Resumen	4
2. Introducción	6
3. Antecedentes	7
3.1 Generalidades de la Epilepsia	7
3.2 GABA y Epilepsia	11
3.3 Vías y Neurotransmisores de la Substancia Nigra	16
3.4 Papel de la Substancia Nigra en las Crisis Convulsivas	19
3.5 Antiepilépticos (Diazepam)	24
3.6 Pentilenetetrazol (Metrazol)	28
4. Problema	31
5. Objetivo	32
6. Metodología	33
6.1 Rotorod	33
6.2 Administración del Pentilenetetrazol	34
6.3 Histología	34
6.4 Análisis de resultados	34
7. Resultados	35
7.1 Efecto de la microinyección intracerebral de Diazepam en las crisis provocadas por la administración subcutánea de Pentilenetetrazol	35
7.2 Efecto de la administración de Diazepam sobre la ejecución motora (prueba del rotorod)	40
8. Discusión	41
9. Conclusiones	45
10. Referencias bibliográficas	46

I. Resumen.

Los efectos de la microinyección de agentes con propiedades anticonvulsivas en la Substancia Nigra (SN), han sido examinados en crisis producidas por la administración sistémica de convulsivantes, incluyendo a la bicuculina, el pentilnetetrazol (PTZ), la estricnina y la pilocarpina, también se ha observado un efecto supresor de las crisis en los modelos de electrochoque y kindling amigdalino. Además, diversos estudios con 2-deoxiglucosa indican que la SN exhibe un gran incremento en la tasa metabólica en asociación con crisis convulsivas. De este modo numerosos estudios indican que la SN tiene influencia inhibitoria sobre las crisis epilépticas.

Por otra parte, el Diazepam (DZ) es un compuesto antiepiléptico bien conocido empleado en el tratamiento de crisis epilépticas, el cual ejerce sus efectos anticonvulsivos a nivel de receptores específicos reforzando el efecto del ácido gama-aminobutírico (GABA).

Por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar si el DZ ejerce su efecto a través de la SN, en un modelo de crisis generalizada producida por PTZ.

Para lo cual se utilizaron ratones machos de la cepa NIH (25-30 g), los cuales se dividieron en tres grupos: Al primer grupo se le aplicó una microinyección bilateral de DZ en la SN, treinta minutos después se inyectó PTZ subcutáneo a una dosis 85 mg/kg, y se valoró durante treinta minutos midiendo los siguientes parámetros: Latencia a la primera sacudida, latencia a la primera crisis, duración de la primera crisis, latencia a la extensión tónica de miembros posteriores, duración de la extensión tónica y porcentaje de sobrevivencia. En el segundo grupo se aplicó solución salina 0.9 %, y se valoró como en el grupo anterior. Y un tercer grupo al cual solamente se le aplicó PTZ.

Los resultados fueron valorados mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía y una prueba Student-Newman-Keuls

Se observaron incrementos estadísticamente significativos en el grupo DZ en la latencia a la primera sacudida y en la latencia a la primera crisis. Sin embargo, en la duración de la primera crisis no se observaron diferencias significativas.

En cuanto al porcentaje de animales que presentaron extensión tónica en el grupo DZ fue del 6.25% (1/16), en el grupo de salina fue del 90.32% (28/31), y en el grupo PTZ el 100% (26/26).

La sobrevivencia en el grupo de DZ fue del 87.5% (14), en el grupo salina fue de 12.904% (4), y del 0% en el grupo PTZ.

Los resultados sugieren que el DZ puede ejercer sus efectos antiepilépticos a través de la SN.

2. Introducción.

La Epilepsia es un trastorno o un grupo de trastornos crónicos, caracterizados por la presencia de crisis recurrentes, estas crisis son la manifestación anormal de un grupo de neuronas, observandose patrones conductuales característicos.

Existen diferentes modelos experimentales que asemejan los tipos de crisis que se presentan en el humano, el agente prototipo en la clase de convulsivantes sistémicos es el pentiltenetrazol o metrazol (PTZ), el cual produce sacudidas mioclónicas que se generalizan a crisis tónico clónico generalizadas.

Por otro lado, el diazepam (DZ) es un compuesto usado en el tratamiento de la epilepsia que actúa a nivel de receptores aumentando la acción del ácido gama-aminobutírico (GABA).

Hay evidencias anatómicas y fisiológicas que indican que las regiones involucradas en la iniciación y propagación de la actividad epiléptica se encuentran en el tallo cerebral, y uno de los núcleos que parece desempeñar un papel importante en la propagación de las descargas epilépticas, es la Substancia Nigra (SN), ya que estudios de lesión muestran una supresión de las crisis en diversos modelos, así mismo la aplicación intranigral de antiepilépticos también confieren protección en crisis epilépticas.

Dado que se conoce que el DZ es un compuesto efectivo en el tratamiento de las crisis epilépticas, el presente trabajo pretende conocer si el sitio de acción del DZ se lleva a cabo en la SN, en un modelo de crisis generalizadas producidas por la aplicación de PTZ en el ratón.

3. Antecedentes.

3.1 Generalidades de la Epilepsia.

Definición.

La Epilepsia es un trastorno cerebral crónico de variadas etiologías, que esta caracterizado por crisis recurrentes debido a una descarga excesiva de neuronas (crisis epilépticas), asociadas con varias manifestaciones clínicas y de laboratorio. (O.M.S. Diccionario de Epilepsia).

Historia.

La palabra "epilepsia" deriva del Griego y significa "apoderarse" o "posesionarse" y se ha empleado desde la época de Hipócrates. Actualmente se prefiere el uso de las denominaciones "trastornos o perturbaciones paroxismales" o bien "ataques", según Millichap (1965) para evitar los estigmas o connotaciones siniestras que se asocian con el término epilepsia. Hipócrates criticó las antiguas creencias que consideraban como enfermedad sagrada a esta afección, así como las ideas de que se debía a que los demonios o dioses se posesionaban del individuo; opinó que la epilepsia era una enfermedad del cerebro, debida a causas naturales y que debía ser tratada con drogas y dietas y no por medio de la magia.

Así como la epilepsia, su tratamiento emergió, desde que la historia lo consigna, de la ignorancia, la superstición y las creencias religiosas. Los epilépticos vivieron, pues, sujetos a una rica variedad de remedios de curanderos, charlatanes y médicos hasta mediados del siglo XIX, a fines del cual John Hughlings Jackson, describe con meticulosidad la ahora epilepsia que lleva su nombre. En colaboración con Gowers sienta las bases científicas para entender el fenómeno crítico de las epilepsias, propuso que las crisis eran consecuencia de "descargas ocasionales, repentinas, excesivas, rápidas y locales de sustancia gris" y que una convulsión generalizada se producía cuando el tejido encefálico normal era invadido por la crisis activa iniciada en el foco anormal (Rall y col., 1985). Así mismo Jackson sentó las bases anatomofuncionales de los fenómenos psicoalucinatorios temporouncinados en la epilepsia.

En un principio, se utilizó el sedante bromuro de potasio en el tratamiento de la epilepsia. A partir de 1912, empezaron a utilizarse los barbitúricos y en un periodo de 25 años

se sintetizaron cerca de 50 compuestos, algunos de los cuales eran potentes antiepilépticos en el hombre, pero con intensa actividad sedante. Afortunadamente para los enfermos, Putman y Merrit descubrieron en 1937 la fenitoína o difenilhidantoína (DFH), cuya efectividad fue probada en convulsiones inducidas por electrochoques en gatos y cuya utilización fue muy benéfica para los epilépticos y aún continúa siendo. En 1944, junto con Goodman inició el estudio de la fisiología y la terapia de cuadros convulsivos experimentales y se introdujo el registro electroencefalográfico para verificar el cuadro convulsivo.

En 1944, Richard y Everett comunicaron que el analgésico trimetadona no protegía contra el electrochoque, pero prevenía las convulsiones inducidas por el pentilente trazol (PTZ), que no eran interrumpidas por la DFH. En 1946 se lanzó al mercado la trimetadona como droga de elección para el tratamiento de las ausencias o pequeño mal, con lo cual estableció la diferencia de las acciones anticonvulsivas entre la trimetadona y la DFH (Martínez de Muñoz, 1983).

Llama la atención que de 1912 a 1960 sólo se descubrieron 16 compuestos efectivos; pero es más sorprendente aún que de 1960 a la fecha sólo se hayan introducido a la terapéutica humana 4 fármacos, no obstante que los compuestos sometidos a evaluación antiepiléptica puedan contarse por cientos. De ahí que las pruebas rutinarias de evaluación de una droga con probable acción anticonvulsiva incluyan en la primera etapa su poder contra el PTZ y el electrochoque.

Crisis epiléptica.

Las crisis son eventos epilépticos discretos, manifestaciones transitorias, hipersincrónicas, del comportamiento neuronal anormal. Existen diferentes tipos de crisis, cada una produciendo un patrón de cambios conductuales característicos y electrofisiológicos los cuales usualmente pueden ser detectados en el registro electroencefalográfico (EEG). Algunos pacientes tienen crisis que sólo ocurren en el curso de una enfermedad neurológica aguda. Otras personas tienen sólo una crisis en su vida por lo cual, la causa nunca es determinada. Estas crisis no son epilepsia.

Según su definición, el atributo que califica las crisis epilépticas es "la descarga neuronal excesiva". Esta descarga se debe a la activación simultánea de un gran número de neuronas, que determinan un sincronismo excesivo (así, se habla más o menos correctamente de "descarga hipsincrónica"). Este carácter excesivo puede expresarse en el espacio y en el tiempo, y puede ser debido a hiperexcitabilidad o bien a falta de inhibición de una población neuronal (Oller et al., 1983).

Los mecanismos mediante los cuales se manifiestan las crisis epilépticas no es conocida del todo, se ha visto que muchos parámetros fisiológicos se alteran durante una crisis epiléptica especialmente el equilibrio metabólico, la función sináptica y el microambiente iónico. En virtud de que todas estas alteraciones se presentan de manera prácticamente simultánea, ha sido sumamente difícil establecer cuál de todos estos factores inició la epileptogénesis (Rubio, 1991). A continuación se mencionan las evidencias experimentales que apoyan los probables factores involucrados en la epileptogénesis:

- Alteraciones de la función sináptica, ya que ésta constituye el proceso central de comunicación interneuronal y por lo tanto del funcionamiento del Sistema Nervioso Central (SNC). Esto se pone más claramente de manifiesto cuando se considera que la actividad de los circuitos neurales depende del equilibrio entre las sinapsis excitadoras y las inhibitorias: si se incrementa la actividad de las primeras o disminuye la de las segundas, habrá una hiperexcitabilidad, que es una de las características definitorias de la aparición de la epilepsia. Es posible producir actividad epiléptica mediante la inhibición de la liberación de GABA, si se administran compuestos capaces de bloquear la entrada de Ca^{++} a través de los canales de calcio sensibles al voltaje de las terminales sinápticas. Tales como un colorante inorgánico, catiónico, conocido como rojo de rutenio, una pequeña cantidad de este compuesto produce intensas convulsiones en el ratón, la rata y el gato. Cuando es administrado por vía intracisternal o intracerebroventricular. Debido a una disminución de GABA consecuente a un bloqueo de los canales de calcio sensibles al voltaje de la terminal sináptica (Rubio, 1991).

- Inhibición de la actividad de la dextracarboxilasa del ácido glutámico (GAD), indican que la actividad de la enzima que sintetiza el GABA, más que la concentración total del aminoácido, es un factor determinante de su función sináptica inhibitoria. Otros resultados indican que la disminución de la actividad de la GAD, enzima muy sensible a la temperatura, pudiera ser un factor causal de las convulsiones febriles.

- Daño de las neuronas GABAérgicas. En un estudio reciente se demostró que la liberación de GABA en rebanadas de hipocampo obtenidas de ratas tratadas con ácido kaínico está disminuida, tanto cuando las rebanadas se obtuvieron en el momento de las convulsiones, como 72 horas después. Esto sugiere que las neuronas dañadas por el ácido kaínico son probablemente interneuronas GABAérgicas, y que las convulsiones se deben, al menos en parte, a la desinhibición resultante de este daño (Tapia, 1991).

De acuerdo con nuevos conceptos, en el sentido de que la activación de los receptores a aminoácidos excitadores como el glutamato, específicamente los receptores al N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA), al ser estimulados de manera repetitiva, disminuyen las respuestas del GABA y viceversa los antagonistas del NMDA facilitan la persistencia del mecanismo inhibitorio a pesar de una estimulación repetida.

Se considera que el sistema GABAérgico o inhibitorio, se altera y en consecuencia los receptores NMDA se activan, a través de los neurotransmisores excitadores particularmente el glutamato o el aspartato, lo cual facilita la apertura de los canales de calcio hacia la célula, lo cual provocará primero alteraciones transitorias, consistentes de una depresión neuronal postictal, así como alteraciones en el metabolismo mitocondrial-oxidativo (Rubio, 1991).

3.2 GABA y Epilepsia.

Los aminoácidos son cuantitativamente el grupo más importante de neurotransmisores en el cerebro de mamíferos. Los dos transmisores inhibidores mejor estudiados son el GABA y la glicina, el GABA parece ser un importante transmisor inhibitor en todas las partes del SNC, mientras que la función inhibidora de la glicina se encuentra principalmente limitada al bulbo y a la médula espinal (Fonnum 1987; Haefely 1989b).

La autoradiografía de alta afinidad al GABA muestra que la concentración más alta de GABA se encuentra en corteza cerebral, hipocampo, y sustancia nigra (Fonnum, 1987).

La importancia del GABA como neurotransmisor ha sido demostrada ya que aproximadamente un tercio de todas las sinápsis del cerebro utilizan GABA en su neurotransmisión (Haefely 1989a). Aunque neuronas GABAérgicas funcionan en regiones específicas del cerebro, al parecer todas las vías neutrales en el cerebro de los mamíferos son inhibidas por GABA (Cooper et al., 1984).

Neuroquímica del GABA.

El GABA es sintetizado a partir del aminoácido L-glutamato por descarboxilación del ácido glutámico con fosfato de piridoxal como cofactor. La transaminasa de GABA (GABA-T) lo degrada en ácido succínico que entra al ciclo de Krebs (Fig. 1). La enzima responsable de su degradación es la transaminasa del GABA que se inactiva por el ácido gama-vinyl-GABA (GVG). Los efectos anticonvulsivos del GVG pueden deberse al reforzamiento de la transmisión GABAérgica.

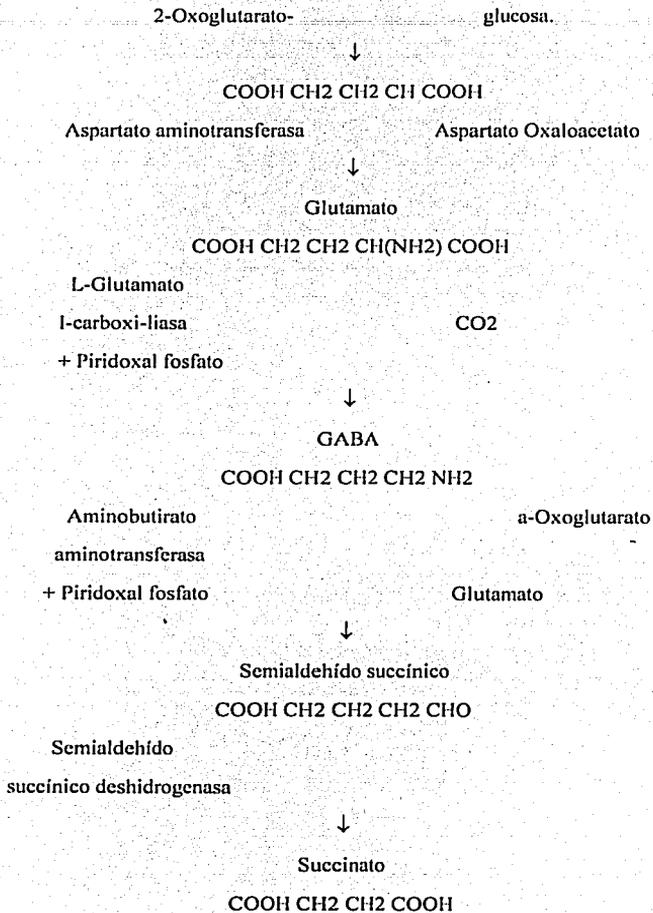


Fig. 1. Síntesis del Acido gama-aminobutírico (GABA).

Numerosos estudios de modelos experimentales de epilepsia indican una pérdida de las terminales GABAérgicas o un déficit de GABA en el foco epiléptico (Ribak, 1987). La bicuculina, un antagonista competitivo del receptor de GABA bloquea la acción de este neurotransmisor y produce convulsiones. Se ha mostrado que la inhibición de la recaptura de GABA con SKF inhibe la propagación y generalización de las crisis epilépticas. También se ha reportado que la administración de GVG suprime las postdescargas electroencefalográficas (Shin et al., 1980). Todos estos resultados, indican que el GABA interviene en los mecanismos inhibidores de la actividad epiléptica. Las drogas que reducen este neurotransmisor en el cerebro o bien sus acciones, promueven las crisis, mientras que las drogas que incrementan la cantidad de GABA se consideran antiepilépticas. Las benzodiazepinas y los barbitúricos que fortalecen la acción del GABA, son utilizados como anticonvulsivos (McIntyre y Racine, 1986; Haefely, 1989b).

Virtualmente todas las neuronas son sensibles al GABA, y los receptores de GABA están distribuidos en todo el cerebro. Muchas neuronas GABAérgicas son interneuronas, presentes en todas las regiones, en números variables. Unas cuantas neuronas GABAérgicas son neuronas de salida con largos axones que se proyectan a regiones distantes, por ejemplo: las neuronas de Purkinje de la corteza cerebral, las neuronas estriatonigrales, las nigrotalámicas y las nigrotectales.

Farmacológicamente se han identificado dos tipos de receptores GABAérgicos que se han clasificado como GABA A y GABA B. El tipo más abundante e importante es el receptor GABA A, este receptor es sensible a la bicuculina y se piensa que sean en su gran mayoría postsinápticos. Se encuentran concentrados en neuronas centrales y en neuronas simpáticas periféricas. Los receptores GABA B (no sensibles a la bicuculina), tienen una distribución diferente a la de los receptores GABA A y parecen estar presentes en terminales presinápticas autonómicas y centrales. Las características de estos dos tipos de receptores se muestran en la tabla I.

La ocupación del receptor por GABA permite la apertura del canal de cloro, resultando en un incremento en la conductancia al cloro, pero algunas veces también hacia fuera de la célula, dependiendo del gradiente de concentración y del potencial de membrana. La conductancia de cloro inducida por GABA puede, por lo tanto, originar una hiperpolarización, depolarización, o no cambiar el potencial de membrana. En todos los casos reduce la excitabilidad neuronal, impidiendo que la membrana alcance el umbral de depolarización crítica para la generación de un potencial de acción o bloqueando la propagación de éste. Estos son los eventos que sostienen la acción inhibitoria sináptica del GABA en la membrana sináptica (Haefely, 1989a).

El receptor GABA A se encuentra relacionado con el canal de cloro (Haefely, 1988). Algunos de estos receptores parecen estar acoplados a sitios moduladores. En estos sitios, drogas como las benzodiazepinas y la picrotoxina pueden actuar para modificar el efecto del GABA en el canal de cloro.

En cuanto al receptor GABA B actúa reduciendo la liberación de otros neurotransmisores como la norepinefrina, glutamato, dopamina o serotonina. El receptor GABA B puede trabajar disminuyendo la entrada de Ca^{++} dentro de la terminal presináptica nerviosa.

Sobre la génesis de la actividad epiléptica existen múltiples teorías, en lo que coinciden los distintos autores es en la importancia que tienen distintos neurotransmisores en esta patología. De tal manera que uno de estos neurotransmisores, el GABA y sustancias afines se han empleado como inhibidores de la actividad epiléptica. Encontrándose protección contra los efectos de la picrotoxina (sustancia que impide el acoplamiento del GABA al canal de cloro en los sitios moduladores).

La función vital de la inhibición GABAérgica es fácilmente demostrada por procedimientos que reducen su eficacia, por ejemplo, bloqueando los receptores a GABA; excitación, ansiedad, convulsiones, decremento generalizado de la función GABAérgica, y la

eliminación localizada de mecanismos GABAérgicos es una simple medida de producir un foco incontrolado de actividad neuronal epileptiforme (Haefely, 1989a).

Tabla 1. Características de los receptores al GABA.

	GABA A	GABA B
Agonista común	GABA	GABA
Agonista selectivo	Muscimol	Baclofen
Antagonista selectivo	Bicuculina	(Acido d-Amino-valérico)
Efectores	Canal de Cl ⁻	Canal de Ca ²⁺ Ach Canal de K ⁺
Modulación alostérica "Benzodiazepinas", barbitúricos, algunos convulsivantes.		?

Tomado de Haefely, W. E. (1989a). Pharmacology of the Benzodiazepine Receptor. Eur. Arch. Psychiatr. Neurol. Sci. 238:294-301.

3.3 Vías y Neurotransmisores de la Substancia Nigra.

La SN es el núcleo más voluminoso de la parte ventral del mesencéfalo, extendiéndose del puente a el diencefalo. La SN contiene cuatro tipos de células, un total de 22 000 en la rata (Poirier et al., 1983).

Tres partes de la SN son generalmente reconocidos: la zona compacta (con densos paquetes de células que ocupan las partes dorsal y medial de la SN), la zona reticulata (con un arreglo suelto de células sobre el pedúnculo cerebral), y la pars lateralis (con abundantes fibras y neuronas localizadas dorso-lateral a las otras dos zonas).

Las vías eferentes de la SN incluyen las proyecciones nigroestriatales, nigrotálamicas, nigrotectales y nigrotegumentales (fig. 2). La primera de estas es dopaminérgica, originándose en la pars compacta; las otras provienen de la pars reticulata y contienen GABA (Childs y Gale, 1983). La proyección nigral dopaminérgica probablemente no es responsable para la modificación de las crisis obtenidas de tratamientos intranigrales, tanto agonistas y antagonistas dopaminérgicos ya que no son efectivos en varios modelos de crisis. La destrucción inducida por neurotóxicas de neuronas estriatonigrales no confieren protección contra las crisis por kindling amigdalino (Albala et al., 1986). En suma, con las lesiones de SN, la protección a las crisis aparentemente dependen del daño específicamente de la región pars reticulata, de las cuales se originan eferentes nigrales no dopaminérgicas (Garant y Gale, 1983).

El GABA es el neurotransmisor inhibitor que se encuentra en las proyecciones de la pars reticulata. Como estas proyecciones son GABAérgicas, el efecto neto de la actividad del GABA en SN es desinhibición de las neuronas en tálamo, tectum (colículo superior), y tegmentum (Kilpatrick et al., 1983).

Resultados recientes indican que la integridad del colículo superior se requiere para proteger contra las crisis por electrochoque máximo seguidas de la aplicación de muscimol intranigral. La destrucción de colículo superior no tiene efecto significativo en la respuesta al electrochoque máximo per se. Sin embargo, en el grupo con lesión de colículo superior respondieron al muscimol intranigral no tuvo efecto anticonvulsivo en crisis por electrochoque. Las ratas

"control" lesión superficial del colículo superior respondieron al muscimol intranigral con una supresión marcada de las crisis por electrochoque. Estos resultados indican que la ablación de colículo superior, pero no de la corteza evita los efectos anticonvulsivos del muscimol intranigral en el modelo de electrochoque máximo. En otros estudios, se ha mostrado que el muscimol intranigral causa un decremento significativo en la tasa de recambio de GABA en la región terminal de las proyecciones nigrotectales (Melis y Gale, 1983), apoyando el concepto de que el aumento en la transmisión GABAérgica en la SN causa una supresión de las neuronas GABAérgicas nigrotectales (Gale y Browning, 1986).

Estudios neuroanatómicos basados en peroxidasa de rábano y técnicas de autoradiografía confirman la existencia de vías eferentes al estriado, tálamo, tegmentum y tectum las cuales se originan en diferentes partes de la SN en la rata, el gato y el mono. La existencia de vías eferentes de la pars reticulata de SN a tálamo y colículo superior es también apoyado por evidencia electrofisiológica (Poirier et al., 1983).

Estudios basados en métodos autoradiográficos anterogradados aplicados separadamente a varios componentes reconocidos del cuerpo estriado en el gato, y en el núcleo subtálmico en el gato y en el mono confirman proyecciones del núcleo caudado y putamen a los segmentos pallidales externos e internos, y en la parte no dopaminérgica de la SN (Nauta, 1986 b).

Además de encontrarse que las proyecciones ventrales del pallidum, como el pallidum dorsal a los núcleos subtálmicos y la SN, tienen además proyecciones a varias estructuras implicadas en el circuito del sistema límbico, particularmente amígdala, núcleo habenular lateral, y al núcleo mediodorsal del tálamo. Con proyecciones más escasas a hipotálamo, al área ventral tegmental, y regiones más caudales del tegmentum cerebro medio, incluyendo la región del núcleo pedunculopontino (Nauta, 1986a).

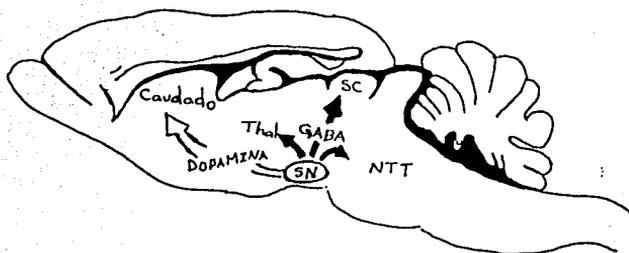


Fig. 2 Sección parasagital del cerebro de la rata, mostrando las proyecciones eferentes de SN. Abrev: SN. Substancia Nigra; NTT. Área nigrotegmental en formación reticular; SC. Colículo Superior; Thal. Núcleo tálamico ventromedial.

3.4 Papel de la Substancia Nigra en Crisis Convulsivas.

En 1982 Iadarola y Gale, identificaron un área del cerebro medio en el cual la actividad anticonvulsiva es fuertemente controlada por GABA, la SN. Observando que la microinyección bilateral de muscimol (agonista del receptor GABA A), en la SN protege contra las crisis inducidas por electrochoque o por la administración de drogas convulsivantes tales como el pentilnetetrazol (PTZ) y la bicuculina. La lesión bilateral de la SN ya sea electrolíticamente y por ácido kainico ha mostrado ejercer efectos anticonvulsivos en crisis provocadas por bicuculina. Las lesiones de SN también reducen la incidencia y duración de la extensión tónica de miembros posteriores en la prueba de electrochoque máximo (Garant y Gale, 1983). Así como en crisis por kindling amigdalino (Bonhaus et al., 1986).

Las lesiones localizadas dorsal a 2 mm caudal a la SN se encontró que no tenían efecto en la prueba del electrochoque máximo, mientras que las lesiones anteriores a la SN en el tracto estriatonigral pareció tener un ligero, aunque no significativo efecto atenuante en el electrochoque máximo (Garant y Gale, 1983).

Los efectos de la microinfusión de agentes con propiedades anticonvulsivantes en SN han sido examinadas en varios modelos. La infusión de sustancias tales como el inhibidor de la enzima que degrada al GABA, el γ -vinil-GABA en SN reduce la severidad de las crisis provocadas por electrochoque, drogas convulsivantes, kindling y crisis audiogénicas (Gale, 1985, 1986; McNamara, 1986; Millan et al., 1987).

Se ha observado que hay una reducción significativa en la severidad de las crisis, umbral, e incidencia en crisis producidas por drogas convulsivantes incluyendo bicuculina, PTZ, estriocina, y pilocarpina (Casu y Gale, 1981; Iadarola y Gale, 1986). La supresión de las crisis ha sido también observada con inyecciones en la SN de agentes anticonvulsivantes en crisis fotomioclónicas en babuino Papio papio (Meldrum y Horton, 1978) y electrochoque en ratas (De Sarro et al., 1985; Garant y Gale, 1985). Estudios realizados por Fariello y Hornykiewicz (1979) y Gale (1986), mostraron que la microinfusión de bicuculina, cobalto, picrotoxina y otros convulsivantes en esta estructura generalmente no ha logrado producir crisis. Aunque,

otros resultados nos muestran que la inyección de dosis altas de bicuculina en SN produjeron crisis, pero con una dosis más alta (100 veces más que en colículo inferior), pero no está claro si el efecto está localizado en la SN (Frye et al., 1986).

Estos descubrimientos han encabezado la hipótesis de que la SN no actúa como un sitio de iniciación de crisis sino más bien como un sitio importante en la propagación de estas crisis (Gale, 1986).

La estimulación eléctrica de la SN fue examinada en tres diferentes especies (gatos, ratas y perros), sin observarse evidencias de actividad convulsiva después de estimular este núcleo. Sin embargo, la estimulación dorsal a la SN en la formación reticular disparó crisis con una intensidad relativamente baja en estos estudios (Kreindler et al., 1958; Bergermann et al., 1963). Por otra parte, estudios realizados por Morimoto y Goddard (1986) encontraron que la estimulación eléctrica de la amígdala o la corteza piriforme retarda el desarrollo de las crisis y reduce la severidad de las mismas. La estimulación de gran intensidad en la SN fue capaz de inducir crisis en este estudio, pero el uso de electrodos monopolares aumentó la posibilidad de que otras estructuras puedan también haber sido afectadas.

La tasa metabólica de la SN en asociación con las crisis exhibe un gran incremento. Así, en ratas con kindling amigdalino, los estudios con 2-deoxiglucosa indican que la SN muestra un gran incremento del metabolismo cuando se alcanza el estado de convulsiones motoras generalizadas (Engel et al., 1978). La administración sistémica de convulsivantes tales como la bicuculina, picrotoxina, ácido kaínico, penicilina y PTZ provoca un extenso incremento en el metabolismo de la SN (Albala et al., 1984; Ben-Ari et al., 1981; Lothman y Collins, 1981; Pazdernick et al., 1985). Resultados similares se obtuvieron en crisis focales corticales producidas por la inyección focal de penicilina, picrotoxina o por la estimulación eléctrica focal repetitiva (Collins et al., 1983).

King et al. (1987) observaron que la aplicación de clonazepam en la SN inhibía las crisis producidas por kindling amigdalino en ratas. Debido a que las benzodiazepinas actúan vía receptor de BZ, el cual es probablemente un sitio modulador del receptor GABA, que potencia

las acciones del GABA, lo cual puede ser observado como un incremento en la frecuencia de canales de Cl⁻ receptor GABA abiertos.

Por otra parte, Chen et al., (1989) estudiaron los efectos de la aplicación focal en la SN de anticonvulsivos clínicamente efectivos, tales como el fenobarbital, carbamazepina y fenitoína en el modelo convulsivo de electroshock en ratas. La eficacia anticonvulsiva fue evaluada mediante la medición de la duración de la extensión tónica antes y después de la inyección. Se encontró que la aplicación de fenobarbital en la SN produce conducta estereotipada y suprime la extensión de manera dosis-dependiente. En contraste, con la aplicación de fenitoína o carbamazepina en la SN no se producen efectos anticonvulsivos. El efecto anticonvulsivo del fenobarbital puede ser parcialmente mediado por el aumento de la transmisión sináptica del GABA y/o por respuestas antagonista a los aminoácidos excitadores.

Trabajos adicionales han comparado el efecto de la aplicación intranigral de dos benzodiazepinas, el midazolam y flurazepam, en crisis provocados por PTZ, y comparar los efectos de la inyección intranigral de GABA o muscimol. En contraste al muscimol y GABA, tanto el flurazepam y midazolam tienen un efecto claro relacionado con la dosis de inhibición de las crisis producidas por el PTZ. Por otra parte, las dosis de muscimol usadas contra las crisis producidas por el PTZ fueron efectivas para bloquear los componentes tónicos de las crisis inducidas por bicuculina (Zhang et al., 1989).

Estudios recientes realizados por Depaulis et al (1990), han mostrado que la vía GABAérgica nigro-colicular es crítica para el control inhibitorio de la SN sobre las crisis generalizadas no convulsivas. Los efectos antiepilépticos de la inyección intranigral bilateral de muscimol (2 ng) fueron revertidos por la lesión electrolítica del colículo superior. El bloqueo de la transmisión GABAérgica a este nivel con picrotoxina (40 ng) suprimió significativamente las crisis generalizadas no convulsivas.

Estos datos sugieren que los efectos antiepilépticos observados por la potenciación de la transmisión GABAérgica en la SN resulta de una desinhibición de los cuerpos celulares coliculares.

La vía GABAérgica nigro-colicular en el control de crisis audiogénicas fue examinada para conocer el efecto de la microinyección bilateral de muscimol (20-80 ng) en la SN, las cuales suprimieron las crisis audiogénicas, pero no así la microinyección bilateral de picrotoxina en el colículo superior (20 y 40 ng), sino que las crisis fueron facilitadas, por lo que estos resultados sugieren que la vía GABAérgica nigro-colicular no está involucrada en el control de esta forma de epilepsia (Depaulis et al., 1990a).

Los efectos de la administración intranigral de fármacos antiepilépticos han sido estudiados en crisis límbicas provocadas por la administración de pilocarpina (380 mg/kg i.p.) en roedores. El midazolam (DE50 38.5 nmol), el fenobarbital (DE50 16 nmol) y la trimetadiona (DE50 30 nmol) protegieron a las ratas contra las crisis, mientras que la difenilhidantoína (mayor a 100 nmol) permaneció sin efecto y la etosuximida (DE50 38 nmol) redujo el umbral para las crisis, ya que con dosis subconvulsivantes de pilocarpina (200 mg/kg i.p.) se convirtieron en convulsivantes. Teniendo un efecto similar con la administración sistémica de estas drogas y por lo tanto se sugiere que la SN puede mediar algunas de las acciones de drogas antiepilépticas (Turski et al., 1990).

La actividad de neuronas de la SN reticulata ha sido estudiada por electrodos en ratas después de la administración oral de benzodiazepinas observando que la actividad neuronal disminuye, sugiriendo que la SN es de importancia en la expresión de crisis convulsivas producidas por la inyección sistémica de metil-B-carbolina-3-carboxilato, (Rosenberg et al., 1990).

Recientemente Mazarati et al (1992), estudiaron el efecto de la administración de galanina en diversas zonas del Sistema Nervioso Central en ratas con kindling químico inducido por la administración de picrotoxina, observando los siguientes resultados: La administración de galanina (2000, 1000 ng) en el ventrículo lateral disminuyó la severidad de las convulsiones, la inyección bilateral (200, 100 y 50 ng) en hipocampo también evocó un efecto anticonvulsivo. Cuando el péptido fue administrado en el núcleo caudado o SN reticulata ejerció acción anticonvulsiva sólo en dosis altas (200 ng), mientras que en el núcleo accumbens

lo hizo en dosis bajas (50 ng). Por otra parte cuando es administrado en el área tegmental ventral en dosis de 50, 100 o 200 ng la galanina falló para reducir las manifestaciones de las crisis por kindling químico.

3.5 Antiepilépticos (Diazepam).

El término benzodiazepina (BDZ) se refiere a la porción de la estructura molecular compuesta por un anillo benceno(A) unido a un anillo diazepina de 7 elementos a partir del cual se llevan a cabo diversas modificaciones estructurales. Virtualmente todos sus efectos resultan de su acción en el SNC, si bien ciertas estructuras del encéfalo son afectadas en mayor medida que otras (Córdova 1991).

Las BDZ's son un grupo de compuestos usados en diferentes trastornos del Sistema Nervioso, ya que han mostrado tener acciones como antiepilépticos, antiespásticos, y drogas antidepresivas. Por ejemplo: el Diazepam (DZ) es empleado en el tratamiento del status epilepticus, el nitrazepam es el más efectivo contra las crisis mioclónicas. Además, las propiedades ansiolíticas de las BDZ's son atribuidas a su participación en la modificación del receptor a GABA (Fonnum, 1987).

Otra de las características importantes de las BDZ's es que son metabolizadas ampliamente por diferentes sistemas enzimáticos microsomales; formándose metabolitos activos que se biotransforman más lentamente que el compuesto original, lo que resulta en una duración de acción más prolongada sin relación alguna con su vida media de eliminación. Por ejemplo, el DZ se transforma por N-dimetilación, en nordiazepam y por 3-hidroxilación y N-dimetilación se convierte en oxazepam, lo cual se traduce en una acción más prolongada de este compuesto (Martínez de Muñoz, 1983).

La química de las BDZ's fue descrita en detalle por Archer y Sternbach (1968). El DZ (7-cloro-1-metil-5-fenil-1,3-dihidro-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona) fue sintetizada por Sternbach y Reeder (1961). Este es un compuesto básico cristalino e incoloro (PM 284.76 daltons) el cual es relativamente insoluble en agua pero se disuelve en solventes orgánicos de polaridad media. Camerman y Camerman (1970) remarcaron una similitud en configuración estérica entre las moléculas de fenitoína y diazepam.

Se ha mostrado que las BDZ's actúan: a) postsinápticamente incrementando la inhibición GABAérgica, b) presinápticamente, aumentando o reduciendo la liberación de neurotransmisor y

c) no sinápticamente reduciendo la conductancia de sodio y potasio dependiente de voltaje, incrementando la conductancia del ion cloro (Macdonald y McLean, 1986).

Efectos bioquímicos.

Ahora se reconoce que las BDZ's ejercen muchas, tal vez todos, sus efectos centrales por virtud de unión a receptores específicos en el cerebro. El receptor del GABA A es una proteína compleja de membrana que incluye al receptor de benzodizepinas, el receptor a barbitúricos, y el canal de Cl⁻ (Squires, 1984; Tallman y Gallager, 1985; Stephenson, 1988). Este complejo receptor ha sido purificado por cromatografía de afinidad en benzodiazepinas inmovilizadas (Stephenson, 1988), y esta compuesto de dos subunidades peptídicas, a (51,000 Mr) y b (57,000 Mr). Se ha propuesto que la estequiometría de las subunidades en el complejo es a₂ b₂ (Mamalaki, et al 1987).

El marcado por fotoafinidad con [3H]flunitrazepam ([3H]-FNZ) o [3H]muscimol sugiere que los sitios de unión de benzodiazepinas están localizadas en la subunidad a, mientras que los sitios de unión del muscimol o GABA pueden estar localizados en la subunidad b (Siegel et al ., 1983; Casalott et al ., 1986; Deng et al., 1986) (Vitorica, J. et al., 1990; Haefely, 1989b). Evidencias farmacológicas sugieren que diferentes receptores a BDZ pueden mediar los efectos anticonvulsivos y los efectos sedantes de estas drogas (Robertson, 1983). Este hecho es posible ya que las BDZ's pueden ser desarrolladas selectivamente.

Los efectos del DZ son mediados por GABA (Ostrovoska y Molodavkin, 1977) y ambos DZ y clonazepam (CLZ) incrementan la respuesta postsináptica a la aplicación local de GABA (Macdonald et al 1985). La unión de BDZ's a receptores por si sólo no tienen efecto a menos que el GABA también se una a receptores GABA adyacentes. En el caso de que las BDZ's se unan refuerzan el efecto del GABA en la abertura de canales iónicos de Cl⁻ en membranas de células nerviosas. Además, la presencia de GABA facilita la unión de BDZ (Tunnicliffe et al 1979).

El DZ inhibe la actividad mitocondrial de la transaminasa del GABA causando un aumento en los niveles de GABA cerebral (Ostroskova et al 1975). Olsen et al (1977) encontraron que el DZ inhibía la captación de GABA en sinaptosomas obtenidos del cerebro de ratón. Estas acciones de la droga pueden permitir un incremento en la concentración de GABA en las sinapsis, lo cual podría reforzar los efectos del DZ y sus receptores. Sawaya et al (1975) demostraron que el CLZ no tenía efecto en la transaminasa del GABA, ni en la succinato semialdehído deshidrogenasa, las dos enzimas que catalizan la degradación del GABA.

A partir de los trabajos de Toman (1977) se propusieron las convulsiones inducidas experimentalmente con el electrochoque y con sustancias convulsivantes como modelos de estudio para evaluar los anticonvulsivos en experimentación. De ahí que las pruebas rutinarias de evaluación de una droga con probable acción anticonvulsiva incluyan en la primera etapa su poder contra el PTZ y el electrochoque.

Generalmente se ha asumido que los efectos de muchos agentes convulsivantes son directamente mediados por sus efectos en sistemas de neurotransmisores específicos. Se ha reportado que la bicuculina bloquea la acción del GABA (Curtis et al., 1971) y que el GABA también inhibe el disparo de las neuronas de la FR (Höslí y Tebecis, 1970). En suma, la especificidad de las acciones de la estricnina, bicuculina, y muchas de las drogas convulsivantes es conocida ya que diversos estudios indican que estos agentes alteran la acción de varios transmisores (Faingold, 1987).

Diez diferentes agentes con propiedades convulsivantes inducen un aumento de la descarga de neuronas de la FR. Se ha propuesto que este fenómeno representa un mecanismo común que sirve al desarrollo de las crisis, el cual puede sólo estar indirectamente relacionado a los efectos de estos agentes en las acciones de neurotransmisores específicos (Faingold, 1978; Faingold et al; 1984). El soporte directo para este concepto ha sido proporcionado por experimentos "In Vitro". Pellmar y Wilson (1977) reportaron que diferentes convulsivantes bloquean el incremento en la conductancia al cloro mediada por una variedad de neurotransmisores en neuronas de invertebrados. Este fenómeno ha sido observado con PTZ

(Pellmar y Wilson, 1977a), penicilina (Pellmar y Wilson, 1977b), estriquina (Faber y Klee, 1974), bicuculina y picrotoxina (Yarowsky y Carpenter, 1978). Los reportes de Barker y colaboradores han indicado que el umbral de las neuronas de la médula espinal en cultivo es reducido por drogas convulsivantes por un mecanismo no relacionado a los efectos en los neurotransmisores (Faingold y Caspary, 1987).

3.6 Pentilenetetrazol (Metrazol).

El uso de modelos experimentales de crisis convulsivas generalizadas ha sido ampliamente usado tanto para la evaluación de fármacos con posibles propiedades anticonvulsivantes; así como para permitir el estudio de los mecanismos de iniciación de la crisis bajo control experimental, en contraste a la situación con crisis espontáneas. Por ejemplo, la administración sistémica de convulsivantes tales como la bicuculina, picrotoxina, y la estriquina han sido ampliamente usados.

Sin embargo, las crisis experimentales más comunmente empleadas en la investigación para nuevas drogas antiepilépticas son las crisis inducidas por electrochoque y pentilenetetrazol (PTZ).

El PTZ es un agente ampliamente usado en la selección, identificación, cuantificación y evaluación de drogas anticonvulsivantes (Leweke et al., 1990; Löscher et al., 1990; Löscher et al., 1991).

El PTZ (6,7,8,9-Tetrahydro-5H-tetrazolo-[1,5-a]azepine), es un compuesto cristalino de P. M. 132.2, el cual se disuelve fácilmente en agua, después de su administración se distribuye rápidamente en el SNC, llevando acabo sus efectos. El PTZ es un derivado del tetrazol con acciones convulsivantes en diversas especies como en el ratón, la rata, el gato y en primates, cuando es administrado por vía parenteral. Inicialmente produce sacudidas mioclónicas, las cuales pueden mantenerse, y pueden llegar a generalizarse en crisis tónico-clónicas.

Los EEGs muestran espigas-onda y poliespigas después de la administración de este compuesto (Fisher, 1989). La inyección de PTZ puede producir descargas epileptiformes en el EEG cortical y movimientos convulsivos característicos en gatos intactos así como en animales con sección de tallo cerebral y médula espinal (Magistris et al., 1988).

Se sabe que la administración sistémica de PTZ induce convulsiones severas en roedores y gatos. Sin embargo, el mecanismo responsable para la acción convulsivante del PTZ permanece sin aclarar (Engstrom y Woodbury, 1988), pues no ha sido completamente dilucidado. Muchos estudios en tejido nervioso de mamíferos han indicado que este agente

bloquea los mecanismos GABAérgicos, principalmente los relacionados al receptor GABA A, mediante los potenciales inhibidores postsinápticos (IPSPs), pero también bloquea la conductancia al potasio (Leweke et al., 1990).

Estudios iniciales sugieren que ejerce sus efectos principalmente en la corteza; sin embargo, trabajos anteriores argumentan que neuronas no específicas de la formación reticular mesencefálica son activadas por la administración sistémica de PTZ antes que las neuronas corticales. En este modelo, el registro de la actividad unitaria de alta frecuencia en la FR mesencefálica precede a la actividad EEG convulsiva cortical, y la sensibilidad de una área mesencefálica reticular en la que la perfusión local de PTZ han sido interpretados como indicativos de que la actividad convulsiva pueda originarse en esta estructura. Otros estudios, han permitido concluir que las crisis producidas por PTZ se originan en el cerebro anterior (Magistris et al., 1988). Mirsky y Ferrendelli (1986, 1987). Recientemente han mostrado el importante papel de los cuerpos mamilares, los tractos anterior talámico y el mamilotálamico en la mediación de las crisis provocadas por PTZ en el ratón y en el cobayo. La inyección de γ -vinyl-GABA, un inhibidor de la degradación de GABA en formación reticular, en el hipotálamo anterior medial e hipotálamo caudal bloquea las crisis inducidas por PTZ en ratas. En el gato, sin embargo, la fase clónica de las crisis parece estar mediada por el cerebro anterior. A nivel sináptico el PTZ parece interactuar con el complejo Receptor de GABA-benzodiazepina-canal de cloro, presumiblemente en algunas vías en las cuales disminuye la potencia de la inhibición y conduce a la ocurrencia de crisis. Pellmar y Wilson (1977) reportaron que el PTZ y otros convulsivantes actúan bloqueando el incremento en la conductancia al cloro mediada por una variedad de neurotransmisores en neuronas de invertebrados. Wilson y Escudé (1989) sugieren que el PTZ bloquea la inhibición mediada por GABA. Agonistas farmacológicos a benzodiazepinas no parecen ser capaces de bloquear las crisis por PTZ, por lo cual otros mecanismos para la inducción de crisis por PTZ pueden ser importantes.

La prueba de PTZ intravenoso (i.v.) fue originalmente descrita por Orloff et al (1949), en estudios en ratón y recientemente adaptado por Pollack y Shen (1985) en ratas. La prueba

umbral al PTZ es predictiva de drogas que son efectivas para el control de crisis generalizadas del tipo pequeño mal (Shen et al., 1990). La administración i. v. de PTZ en ratón para la presencia de crisis clónicas es cerca de 50 mg/kg y para crisis tónico-clónicas es de 90 mg/kg. La administración subcutánea de PTZ resulta en crisis clónicas en el 97% de los animales probados (DC97) con una dosis de 85 mg/kg en ratón y 70 mg/kg en rata.

El PTZ fue adoptado como una prueba de selección para anticonvulsivantes, en parte, por el descubrimiento de la droga anti-ausencia, etosuximida, la cual no alteró el umbral convulsivo al electrochoque máximo. En contraste, algunas drogas efectivas contra crisis por electrochoque máximo, tal como la fenitoina y carbamazepina, no son efectivos contra las crisis por PTZ. (Fisher, 1989).

4. Problema.

Los estudios más antiguos de la participación del Tallo Cerebral en la epilepsia se concentran en la Formación Reticular (FR), y en los últimos años la Substancia Nígra (SN) ha llegado a ser de gran interés. Las estructuras del diencéfalo y cerebro anterior se han relacionado en forma importante en la red neuronal que interviene en las crisis, de acuerdo con vías del Tallo Cerebral, y una área adyacente a la corteza prepiriforme que ha sido llamada "Área Tempestas" (Gale, 1986).

En los últimos años, las investigaciones han renovado el papel de las redes neuronales del Tallo Cerebral como una vía que sirve para la generalización de crisis epilépticas. La relevancia de la acción de drogas antiepilépticas en estas vías ha sido investigada por su habilidad para bloquear la iniciación y propagación de las crisis (Faingold, 1985).

Trabajos adicionales han comparado los efectos de la aplicación intranigral de fármacos antiepilépticos en diferentes modelos de crisis provocados por la convulsivantes incluyendo a la bicuculina, estriocina, PTZ y pilocarpina, kindling amigdalino, electrochoque y crisis audiogénicas (Gale, 1985; Chen et al., 1989; King et al., 1987; Shen et al., 1990; Zhang et al., 1989).

5. Objetivos.

- 1) Valorar el efecto de la microinyección de Diazepam en la Substancia Nigra sobre las crisis provocadas por la administración de metrazol.**

- 2) Valorar el efecto de la aplicación intracerebral de Diazepam sobre la actividad epiléptica provocada por el PTZ.**

6. Metodología.

Se utilizaron (n= 108) ratones machos de la cepa NIH de 25 a 30 g. Los cuales fueron valorados por la prueba del rotorod.

Para las microinyecciones se construyeron cánulas con agujas de insulina calibre 27 con una longitud de 5 mm. Estas cánulas se conectaron a una microjeringa Hamilton de 10 μ l por medio de una tubo de polietileno. Se administró diazepam (DZ) a una dosis de 1 μ g/0.2 μ l.

Los ratones seleccionados se dividieron en tres grupos. Al primer grupo (n= 16) se les inyectó 0.2 μ l de DZ bilateralmente, 30 minutos después se valoraron mediante la prueba del rotorod. Posteriormente se les inyectó pentilinetetrazol (PTZ), y se les observó durante 30 minutos midiendo los siguientes parámetros: latencia a la primera sacudida, latencia a la crisis tónica, duración de la crisis tónica, latencia a la extensión tónica, duración de la extensión tónica, latencia a la muerte y porcentaje de sobrevivencia. Al segundo grupo (n= 31) se les inyectó solución salina al 0.9%, 0.2 μ l bilateralmente en la SN, procediendo de la misma forma que para el grupo anterior. Y un tercer grupo (n= 26) a los cuales solamente se les inyectó PTZ subcutáneo midiendo los parámetros antes mencionados.

6.1 Rotorod.

Con el fin de valorar la neurotoxicidad relativa del fármaco usado se empleó la técnica del rotorod, para lo cual los animales fueron colocados en un cilindro con un diámetro de una pulgada que gira a una velocidad de 6 rpm. durante tres minutos. Los ratones normales pueden permanecer indefinidamente en la barra giratoria a esta velocidad. El déficit neurológico (por ejemplo: ataxia, sedación, hiperexcitabilidad), es indicado por la incapacidad del animal para mantener el equilibrio en la barra por lo menos un minuto en cada uno de los tres intentos (Krall et al; 1978). Cuando los animales caían, estos eran puestos en el cilindro aproximadamente 5 segundos después de haber perdido contacto con la superficie de la barra. Se cuantificó el número de caídas durante 3 minutos y proveyó la medida de la ejecución motora.

Antes de los experimentos, los animales fueron entrenados caminando en la barra durante una sesión de cinco minutos a 6 rpm, la cual es la velocidad usada en los experimentos. Todos los

ratores fueron seleccionados para estar seguros de que podían permanecer en la barra por cinco minutos antes de la administración de la droga; los que fallaban no fueron utilizados.

6.2 Administración del Pentilenetetrazol (PTZ).

El pentilenetetrazol (Sigma) fue disuelto en solución salina al 0.9 %, y administrado subcutáneamente en un pliegue de la piel de la nuca a una dosis de 85 mg/kg de peso. Después de la administración del fármaco los animales presentaron una actividad motora caracterizada por clonus de las extremidades anteriores y de la mandíbula, seguido por movimientos clónicos asincrónicos generalizados. Esta fase precede generalmente a una convulsión tónica en la que los movimientos de las extremidades consisten en flexión seguida de extensión (Goodman y Gilman, 1989).

6.3 Histología.

La localización de los sitios de microinyección fue verificada histológicamente para lo cual los animales fueron decapitados, se les extrajo el cerebro, fijándolo en formaldehído al 4 % y posteriormente cortándolo en un microtomo de congelación que utiliza CO₂. Los cortes con un grosor de 100-120 µm, fueron montados en un portaobjetos por medio de flotación en una solución al 1 % de gelatina y secados a temperatura ambiente.

6.4 Análisis de resultados.

Todos los resultados fueron analizados de acuerdo con el sitio de microinyección. Los datos obtenidos fueron analizados mediante las siguientes pruebas estadísticas: análisis de varianza de una vía (ANOVA), una prueba de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls (SNK), y la prueba exacta de Fisher. La prueba de déficit neurológico fue evaluada mediante la prueba estadística "t" de Student (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1974).

7. Resultados.

7.1 Efecto de la microinyección intracerebral de Diazepam en las crisis provocadas por la administración subcutánea de Pentilenetetrazol.

En el presente experimento los efectos de la microinyección intranigral de diazepam (DZ) en crisis provocadas por la inyección de PTZ (s.c.) fueron examinados. Así mismo se realizaron microinyecciones con solución salina con el objeto de conocer si los efectos eran debidos a la lesión provocada por el volumen y/o el traumatismo (introducción de la cánula). Después de los experimentos los animales fueron decapitados y los cortes histológicos fueron realizados después de permanecer los cerebros en una solución de formaldehído al 4 % durante una semana, y se determinó la localización de los sitios de microinyección (fig. 3).

También se realizaron microinyecciones intracerebrales en las siguientes regiones o núcleos del cerebro y no se obtuvo protección contra las convulsiones inducidas por pentilenetetrazol (PTZ): Zona Incerta, Núcleo Ventral del Tálamo, Núcleo Posterior del Hipotálamo, Fascículo Dorsal de Schütz, Area Hipotálmica Lateral, Núcleo Subtálamico, Fascículo Medial Telencefálico, Pedúnculo Cerebral, Fascículo Longitudinal Medial, Sustancia Gris Periventricular, Núcleo Tegmental Lateral, Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo, Núcleo Premamilar Ventral, Núcleo Dorsomedial del Tálamo, Núcleo Lateral del Tálamo, pars posterior, Tracto Mamilotegmental.

La administración sistémica (s.c.) de PTZ en ratones produjo crisis tónico-clónicas con una dosis convulsiva (DC100) de 85 mg/kg. Krall et al (1978) y Fisher (1989) proponen que esta dosis es letal en un 97 %, pero utilizando ratones de diferente cepa. En nuestros resultados hay un 100 % de mortalidad (grupo PTZ) (Tabla 2). Después de la aplicación del convulsivante los animales presentaron piloerección, salivación y movimientos masticatorios, abducción, clonus de miembros anteriores seguidos de la crisis convulsiva generalizada la cual es generalmente precedida por la extensión de miembros posteriores en la que se presenta una flexión seguida de la extensión. La crisis convulsiva generalizada se definió como la pérdida de contacto de las extremidades con la superficie (saltos y vueltas del animal).

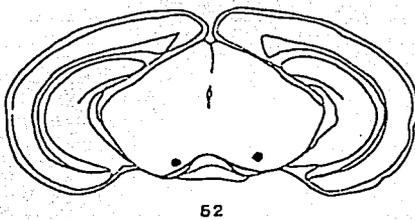
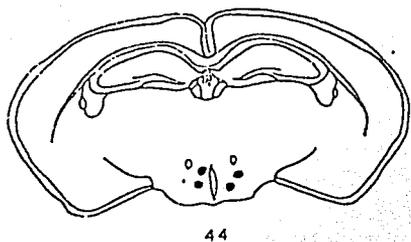
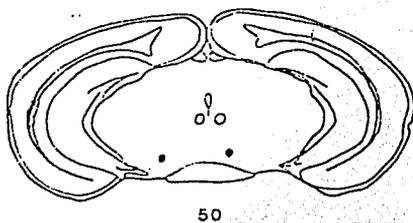
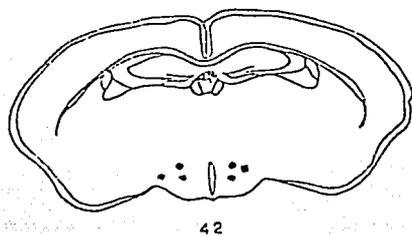
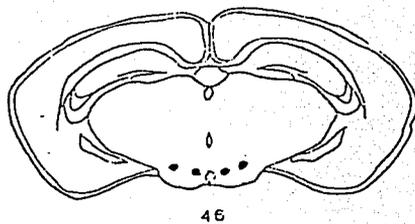
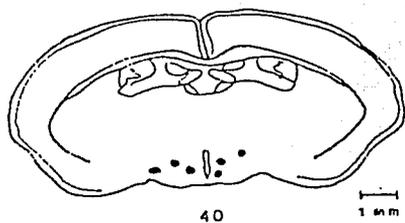
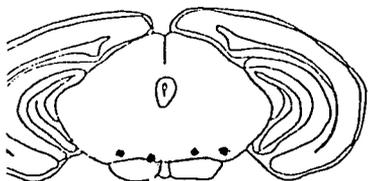
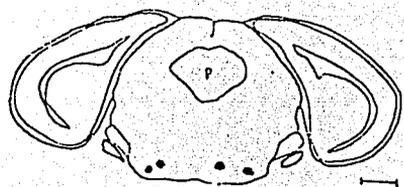


Figura 3. Cortes coronales del cerebro que muestran los sitios de microinyección.

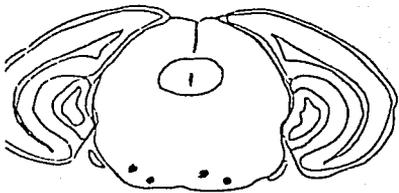


54



58

1 mm



56

Figura 3. Cortes coronales del cerebro que muestran los sitios de microinyección (continuación).

La latencia a la primera sacudida (LPS) inducida por el PTZ se presentó a los 80.423 ± 2.873 seg después de la aplicación del convulsivante en el grupo PTZ o control, 171.5 ± 12.865 seg en el grupo DZ y 136.226 ± 10.708 seg en el grupo salina, observándose que existen diferencias estadísticamente significativas después de aplicarse una ANOVA de una vía ($F=19.9$; $p<0.05$).

En cuanto a la aparición de la primera crisis (LPC), se observó que en el grupo PTZ, se presentó a los 111.153 ± 6.877 seg a diferencia del grupo DZ en el cual fue de 402.562 ± 54.380 seg su aparición y por último el grupo salina a los 194.0 ± 11.464 seg también presentándose diferencias estadísticamente significativas después de su análisis, con una $p \leq 0.05$.

Por otra parte, el ANOVA no reveló diferencias estadísticamente significativas entre grupos en cuanto a la duración de la primera crisis.

La tabla 2 muestra que en el grupo DZ no se presentó la extensión tónica de miembros posteriores, mientras que en el grupo PTZ la latencia fue de 270.807 ± 24.825 seg, y en el grupo salina de 237.4 ± 18.743 seg. El porcentaje de animales que presentaron la extensión tónica en el grupo DZ fue del 6.25 % (1/16), en el grupo salina fue del 90.32 % (28/31), y en el grupo PTZ el 100 % (26/26) de los animales presentaron la extensión tónica (Prueba exacta de Fisher, $p=0.0012$). La duración de la extensión tónica para el grupo PTZ fue de 16.307 ± 2.368 seg y de 14.0 ± 0.641 seg en el grupo salina.

La latencia a la muerte en el grupo PTZ fue de 300.153 ± 25.466 seg y en el grupo salina de 269.291 ± 21.987 seg. La sobrevivencia en el grupo DZ fue del 87.5 % (14/16), en el grupo salina fue del 12.904 % (4/31), y del 0 % (26/26) en el grupo PTZ (Prueba exacta de Fisher, $p=0.0010$).

Tabla 2. Efecto del DZ (1µg/0.2µl/lado) en SN en crisis convulsivas inducidas por PTZ (85 mg/kg) en el ratón.*

n	TTO.	LPS	LPC	DPC	%EXT	%SOB
26	PTZ	80.423 ± 2.873	111.153 ± 6.877	16.346 ± 0.331	100.00	0
16	DZ	171.500 ± 12.865	402.562 ± 54.380	19.125 ± 1.754	6.25	87.50
31	SAL	136.226 ± 10.708	194.000 ± 11.464	12.821 ± 2.338	90.32	12.904

* Los valores observados son la media ± e.e.m., expresados en seg., n, número de animales. (F= 19.9; p≤ 0.05).

30

7.2 Efecto de la administración de Diazepam sobre la ejecución motora (prueba del rotorod).

Para conocer el efecto que pudiese presentar la aplicación del DZ intracerebral sobre la ejecución motora después de la administración del fármaco se procedió a colocar a los animales sobre el rotorod y se cuantificó el número de caídas. Obteniéndose los siguientes resultados, el grupo DZ presentó un promedio de 4.09 ± 1.486 (media \pm e.e.m.) de caídas, mientras que en el grupo salina fue de 6.047 ± 1.281 . Después de su análisis estadístico (prueba "t" de Student), no se observaron diferencias estadísticamente diferentes entre las medias de los dos grupos, (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la microinyección sobre la ejecución motora en el ratón (prueba del rotorod)*.

TTO	número de caídas
DZ	4.09 ± 1.486
salina	6.047 ± 1.281

* Los valores observados son la media \pm e.e.m. $p= 0.35$.

En el grupo DZ hubo seis animales que no mantuvieron el equilibrio sobre la barra giratoria, mientras que para el grupo salina los animales que no mantuvieron el equilibrio fueron ocho.

Lo que sugiere que la administración del fármaco no produce déficit motor ni sedación, manifestandose por no encontrarse diferencias con el grupo de solución salina. El cual fue diseñado para conocer si los efectos eran debido a la lesión provocada por el volumen y/o el traumatismo (introducción de la cánula).

8. Discusión.

El sitio o sitios en el cerebro en el cual los anticonvulsivantes de uso clínico actúan suprimiendo las crisis no es conocido. Diversos experimentos sustentan la conclusión de que la SN es uno de los múltiples sitios en el cual la administración de fármacos antiepilépticos ejercen su acción anticonvulsivante. Estos efectos anticonvulsivos pueden ser parcialmente mediados por el aumento de la transmisión sináptica de GABA y/o antagonizando las respuestas a aminoácidos excitadores, ambos pueden producir los efectos conductuales observados. Aunque se piensa que el principal sistema de neurotransmisión alterado, pero no el único, es el sistema GABAérgico, ya que la aplicación sistémica y iontóforética de bicuculina, estriquina, y PTZ también como varios agentes con propiedades convulsivantes actúan afectando la acción del GABA, glicina y acetilcolina (Faingold, 1987).

La SN ha sido ampliamente estudiada y se conoce que se encuentra fuertemente controlada por GABA. Este hecho es apoyado por que la microinyección de γ -vinil-GABA (GVG) o muscimol en SN resultó en una supresión del clonus inducido por bicuculina y PTZ. Por otra parte, las inyecciones intranigrales de GVG o muscimol suprimen las crisis por kindling amigdalino. Consistente con esto, la lesión bilateral de SN, tanto excitotóxica como electrolítica, es capaz de suprimir las convulsiones clónicas y las tónicas inducidas por bicuculina en ratas.

Los mecanismos por los cuales la lesión de SN suprimen las descargas convulsivas no es conocido, pero es sujeto de intensa investigación y especulación. Parece que la SN por sí misma no inicia las descargas convulsivas (Garant y Gale, 1983), porque la estimulación de SN por la microinyección de drogas convulsivantes (Iadarola y Gale, 1982) o por estimulación eléctrica (Bergmann et al., 1963) no desencadena actividad convulsiva.

De acuerdo con los trabajos anteriores un papel importante de la SN en la mediación de convulsiones generalizadas ha sido propuesta, y la microinyección de drogas GABAérgicas en este sitio tiene actividad anticonvulsivante en una variedad de crisis experimentales (Gale, 1985).

Por otra parte, el efecto de anticonvulsivos de uso clínico ha sido estudiado, por ejemplo la administración intranigral de clonazepam inhibe las crisis por kindling amigdalino (King et al., 1987).

La aplicación de fenobarbital, carbamazepina y fenitoína fueron estudiados en el modelo convulsivo de electrochoque máximo en ratas. Obteniéndose que el fenobarbital suprime la extensión tónica y produce conducta estereotipada. Por otra parte, la carbamazepina y fenitoína no protegieron pero sin presentar cambios conductuales (Chen et al., 1989). Otros fármacos antiepilépticos han sido estudiados en crisis límbicas provocadas por la administración de pilocarpina (380 mg/kg i.p.) en roedores. El midazolam, fenobarbital y la trimetadiona protegieron a las ratas contra las crisis, mientras que la difenilhidantoína permaneció sin efecto y la etosuximida redujo el umbral para las crisis, ya que con dosis subconvulsivantes de pilocarpina (200 mg/kg i.p.) se convirtieron en convulsivantes. Esto indica que aunque la SN media la acción de drogas antiepilépticas previniendo las crisis por pilocarpina, diferentes redes neuronales pueden estar involucradas en la expresión de la acción anticonvulsivante en otros modelos de crisis convulsivas. Estos hallazgos demostraron que la SN puede no ser el único sitio del cerebro involucrado en el control de la epileptógenesis. Sin embargo, evidencias de modelos de crisis apoyan la hipótesis de que la SN es importante para la expresión de convulsiones e indican que algunos aspectos de la epileptógenesis están sujetos al control por la SN (Turski et al., 1990).

Zhang et al (1989) compararon el efecto de la aplicación intranigral de dos benzodiazepinas, el midazolam y flurazepam, en crisis por PTZ, y compararon los efectos de la microinyección intranigral de GABA o muscimol. El flurazepam y midazolam tienen un claro efecto inhibiendo las crisis por PTZ. Por otra parte, las dosis de muscimol usadas contra las crisis por PTZ no fueron efectivas para bloquear los componentes tónicos de las crisis por bicuculina.

También se ha reportado que la administración del péptido endógeno galanina en SN, así como otras regiones del cerebro, revelan que exhibe efectos anticonvulsivos bajo condiciones de kindling químico inducido en ratas por la administración de picrotoxina (Mazarati et al., 1992).

Por lo que respecta a nuestros resultados podemos observar que la aplicación de DZ en este sitio confiere cierta protección contra las crisis producidas por el PTZ en los siguientes parámetros evaluados: latencia a la primera sacudida (LPS), ya que se observó que en la LPS se retardó su aparición en un 50% con respecto al grupo salina, en la latencia a la primera crisis generalizada (LPC) se obtuvo una protección significativa en el grupo DZ con respecto al grupo PTZ.

En cuanto a la duración de la primera crisis tónico-clónica generalizada se encontró que el grupo DZ presentó un ligero aumento aunque no estadísticamente significativo.

Uno de los criterios más comúnmente usados como protección de un fármaco antiepiléptico es la ausencia de extensión tónica de miembros posteriores (Krall et al., 1978). En nuestros resultados podemos observar que en el grupo DZ hay una protección del 93.75% ya que solamente un animal presentó la extensión tónica, en el grupo PTZ todos los animales presentaron la extensión tónica. Y en el grupo salina solamente tres animales no presentaron la extensión, es decir el 90.32% presentaron la extensión tónica.

Se conoce que la administración sistémica de fármacos antiepilépticos, tales como las benzodiazepinas y los barbitúricos, producen sedación y somnolencia en dosis que inhiben las convulsiones. También se ha observado que la aplicación tópica de estos fármacos es dependiente de la dosis ya que las dosis que inhiben las crisis generalmente producen sedación. Otros estudios han mostrado que la administración sistémica de drogas anticonvulsivantes revierten efectivamente las convulsiones inducidas en la Formación Reticular (FR) en dosis que no producen sedación (Browning, 1987). Por esta razón se procedió a evaluar este parámetro mediante la prueba del rotorod. La cual es la prueba más comúnmente empleada para determinación y cuantificación del "déficit neurológico mínimo" diseñada por Dunham y Miya (1978). Nuestros resultados después de aplicarse la prueba "t" de Student se observó que no difieren las medias de los dos grupos. Lo que nos indica que los animales que caían de la barra del grupo DZ no era debido al efecto del fármaco sobre la actividad motora, sino debido posiblemente al efecto que tiene la introducción de la cánula y/o la administración de volumen.

Un aspecto importante es el hecho que diferentes grupos de investigación reporten diferentes datos experimentales sobre el mismo compuesto en dosis comparables en los mismos modelos y especies esto sugiere fuertemente que hay factores técnicos, biológicos, y/o factores farmacológicos así como modelos, especies y rutas de administración los cuales afectan los datos experimentales obtenidos por procedimientos aparentemente estandarizados. Hay varios reportes en la literatura que abordan factores, como especie, cepa, sexo, edad, temperatura, dieta, ritmos endógenos y exógenos en el laboratorio para la evaluación de las drogas antiepilépticas (Löscher et al., 1990).

9. Conclusiones.

(1) Las convulsiones inducidas por la administración s.c. de PTZ (dosis 85 mg/kg) fueron prevenidas por la aplicación intranigral bilateral de diazepam, en los siguientes parámetros: la latencia a la primera sacudida así como a la latencia a la primera crisis tónico-clónica generalizada.

(2) Los resultados del presente estudio sugieren que la SN es un sitio crítico en la mediación de la inhibición de ciertos componentes de las crisis tónico-clónicas generalizadas por la activación de la transmisión GABAérgica. Tales como la extensión tónica de los miembros posteriores.

(3) Al grupo de ratones a los cuales se les administró Diazepam en regiones ventrales del tálamo (núcleo ventral del tálamo, etc.), no se encontró una protección a las crisis provocadas por la administración de PTZ. Lo cual coincide con las observaciones obtenidas por Moshé et al (1985), en el que observó que la lesión de regiones ventromediales del tálamo no modificaron la susceptibilidad de las crisis tónico-clónicas inducidas por flurothyl en la rata.

(4) En la prueba de la Ejecución motora (rotorod) se observa que no existe sedación y/o somnolencia provocada por la administración del diazepam intranigral, ya que con respecto a la media del grupo salina no existen diferencias después de su análisis estadístico, y es observado por que los animales mantuvieron el equilibrio sobre la barra.

10. Referencias bibliográficas.

- Albala, B., Moshé, S., Cubells, J., Sharpless, M., Makman, M. (1986). Unilateral Perisubstantia Nigra Catecholaminergic Lesions and Amygdala Kindling. *Brain Research*. 370:388-392.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Riche, D., Ghilini, G., and Naquet, R.(1981). Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculine or pentetrazole: Metabolic mapping using de deoxyglucose method with special reference to pathology of epilepsy. *Neuroscience*. 6:1361-1391.
- Bergmann, F., Costin, A., and Gutman, J. (1963). A low threshold convulsive area in the rabbit's mesencephalon. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol*. 15:683-690.
- Bonhaus., D. W., Walters, J. R., and McNamara, J. O. (1986). Activation of substantia nigra neurons: Role in the propagation of seizures in kindled rats. *J. Neurosci*. 6:3024-3030.
- Brown, T. R. (1982): En: *Pharmacology of Benzodiazepines*, editado E. Usdin, P. Skolnick, J. F. Tallman, D. Greenblatt, and S. M. Paul, Macmillan Press, London. pp. 329-337.
- Browning, A. R. (1987). Effect of lesions in Seizures in Experimental Animals. En: *Epilepsy and the Reticular Formation: The Role of the Reticular Core in Convulsive Seizures*, editado Fromm, H., Alan R. Liss, Inc. pp. 148-151.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E., Roth, R. H. (1984). *Las Bases bioquímicas de la farmacología*. Manual Moderno (eds); México, D.F. 200-226, 260-270.

- Corcoran, M, and Mason, S. (1980). Role of Forebrain Catecholamines in Amygdaloid Kindling. *Brain Research*. 190:473-484.
- Córdova López, S.,(1991). Status Epilepticus: Aspectos Farmacológicos. *Arch. Inst. Neurol. Neurocir.* 6 (Suplemento):S50-S57.
- Chen, L. S., Millington, D. S., Maltby, D. A. y McNamara, J. O. (1989). Effects of intranigral application of clinically-effective anticonvulsant on electroshock-induced seizures. *Neuropharmacology*. 28(8): 781-786.
- Childs, J. and Gale, K. (1983). Neurochemical Evidence for a Nigrothalamic GABAergic Projection. *Brain Research*. 258:109-114.
- Depaulis, A., Vergnes, M., Liu, Z., Kempf, E., Marescaux, C. (1990). Involvement of the nigral output pathways in the inhibitory control of the substantia nigra over generalized non convulsive seizures in the rat. *Neuroscience*, 39 (2): 339-349.
- Depaulis, A., Marescaux, C., Liu, Z., and Vergnes, M. (1990a). The GABAergic nigro-collicular pathway is not involved in the inhibitory control of audiogenic seizures in the rat. *Neurosci. Lett*, 111 (3): 269-274.
- DiChiara, G., Porceddu, M., Morelli, M., Mulas, M., Gessa, G. (1979). Evidence for a GABAergic Projection from the Substantia Nigra to the Ventromedial Thalamus and to the Superior colliculus of the Rat. *Brain Research*. 176:273-284.
- Engel, J. Jr., Wolfson, L., and Brown, L. (1978). Anatomical correlates of electrical and behavioral events related to amygdaloid kindling. *Ann. Neurol*. 3:235-245.

- Engstrom, F. L., and Woodbury, D. M. (1988). Seizures Susceptibility in DBA and C57 Mice: The Effects of Various Convulsants. *Epilepsia*. 29(4):389-395.
- Enna, S. J. and Hanns Möhler.(1987) γ -Aminobutyric Acid (GABA) Receptors and Their Association with Benzodiazepine Recognition Sites. En *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*, editado por Herbert Y. Meltzer. Raven Press. New York. pp.265-272.
- Faingold, C. L. (1987). The Role of the Brain Stem in Generalized Epileptic Seizures. *Metabolic Brain Disease*. 2(2):81-112.
- Faingold, C. L. and D. M. Caspary (1987). Effect of Convulsant Drugs on the Brain-Stem. En: *Epilepsy and the Reticular Formation: The Role of the Reticular Core in Convulsive Seizures*, editado por H. Fromm. Alan R. Liss, Inc. N. Y. 39-80.
- Feria, V. A., Martinez, de M. D. y Rubio, D. F. (1989). *Epilepsia: Un enfoque multidisciplinario*. Trillas. México, D.F. 22-25, 74-75, 102-104.
- Fisher, S. R. (1989). Animals models of epilepsies. *Brain Research Reviews*. 14:245-278.
- Fonnum, F., (1987) En: *Psychopharmacology. The Third Generation of Progress*, editado por Herbert Y. Meltzer, Raven Press. New York. pp. 173.
- Fromm, H. G. y Terrence, F. C. (1987). Effect of Antiepileptic Drugs on the Brain-Stem. En: *Epilepsy and the Reticular Formation: The Role of the Reticular Core in Convulsive Seizure*, editado Fromm, H., Alan R. Liss, Inc. pp.127.

- Frye, G. D., McCown, T. J., Breese, G. R., and Peterson, S. L. (1986). GABAergic modulation of inferior colliculus excitability: Role in the ethanol withdrawal audiogenic seizures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237:478-485.
- Gale, K. (1985). Mechanisms of seizure control mediated by γ -aminobutyric acid: role of the substantia nigra. *Fed. Proc.* 44: 2414-2424.
- Gale, K. (1986). Role of the substantia nigra in GABA-mediated anticonvulsant actions. In Delgado Escueta, A. V., Ward, A. A., Jr., Woodbury, D. M., and Porter, R. J. editado *Basic Mechanisms of the Epilepsies (Advances in Neurology, Vol. 44)*, Raven Press. New York, pp.343-364.
- Gale, K. (1989). GABA in Epilepsy: The Pharmacologic Basis. *Epilepsia (Suppl. 3):* S1-S11.
- Gale, K. and Browning, R. A. (1986). Anatomical and Neurochemical Substrates of Clonic and Tonic Seizures. En: Dichter, M. A. (ed). *Mechanisms of Epileptogenesis. The Transition to Seizure.* Plenum Press. New York. pp. 111-152.
- Garant, D. S. and Gale, K. (1983). Lesions of substantia nigra protect against experimentally induced seizures. *Brain Research* 273:156-161.
- Garant, D. S. and Gale, K. (1985). Infusion of opiates into substantia nigra protects maximal electroshock seizures in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234:45-48.

- Haefely, W. (1988). Partial Agonists of the Benzodiazepine Receptor: From Animal Data to Results in Patients. In: Chloride Channels and Drugs, edited by Giovanni Biggio and Erminio Costa. Raven Press. New York. pp. 245.
- Haefely, W. E. (1989a). Pharmacology of the Benzodiazepine Receptor. Eur. Arch. Psychiatr. Neurol. Sci. 238:294-301.
- Haefely, W. E. (1989b). Pharmacology of the Allosteric Modulation of GABA A Receptors by Benzodiazepine Receptors Ligands. In: Allosteric Modulation of Amino Acid Receptors: Implications edited by E. A. Bernard and E. Costa. Raven Press, Ltd., New York. pp. 47-69.
- Iadarola, M. J., and Gale, K. (1982). Substantia nigra: Site of anticonvulsant activity mediated by γ -aminobutyric acid. Science. 218:1237-1240.
- Jasper, H. Herbert. (1983). Epilogo en Epilepsia, editado por A. A. Ward, Jr; J. K. Penry, y D. Purpura. Raven Press. New York. pp. 392-393.
- Kalichman, M. W. (1982). Pharmacological investigation of convulsant γ -Aminobutyric Acid (GABA) antagonists in amygdala-kindled rats. Epilepsia. 23:163-171.
- Kalichman, M. W., and McIntyre, D. C. (1980). Locomotor and convulsive response to picrotoxin in amygdala kindled rats. Experimental Neurology. 70:167-172.
- Krall, R. L., Penry, J. K., White, B. G., Kupferberg, Swinyard, E. A. (1978). Antiepileptic drugs development. II. Anticonvulsant drug Screening. Epilepsia. 19:409-428.

--Kilpatrick, I., Starr, M., Fletcher, A., James, T., MacLeod, N. (1980). Evidence for a GABAergic Nigrothalamic Pathway in the Rat. Behavioral and Biochemical Studies. Exp. Brain Research. 40:45-54.

--King, P. H., Shin, C., Mansbach, H. H., Chen, L. S. y McNamara, J. O. (1987). Microinjection of benzodiazepine into substantia nigra elevates kindling seizure threshold. Brain Research. 423:261-268.

--Leweke, F. M., Louvel, J., Rausche, G., y Heinemann, U. (1990). Effects of pentetrazol on neuronal activity and on extracellular calcium concentration in the rat hippocampal slices. Epilepsia Research. 6:187-198.

--Löscher, W., Nolting, B., y Fassbender, Ch. P. (1990). The role of technical and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. I. The influence of administration vehicles. Epilepsia Research. 7:173-181.

--Löscher, W., Hönack, D., Fassbender, Ch. P., y Nolting, B. (1991). The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizures models. Epilepsia Research. 8:171-189.

--Lothman, E. W., and Collins, R. C. (1981). Kainic acid induced limbic seizures: Metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. Brain Research. 218:299-318.

--Lloyd, K. G. and P. L. Morselli. (1987). Psychopharmacology of GABAergic Drugs. En Psychopharmacology: The Third Generation of Progress, editado por Herbert Y. Meltzer. Raven Press. New York. 183-195.

- Macdonald, L. R., and McLean, J. M. (1986). Anticonvulsant Drugs: Mechanisms of Action. In: Delgado-Escueta, A. V., Ward, A. A., Jr., Woodbury, and Porter, R. J. (eds). *Advances in Neurology*, Vol. 44. Raven Press. New York. pp. 726.
- Magistris, M. R., Mouradian, M. S., and Gloor, P. (1988). Generalized Convulsions Induced by Pentylentetrazol in the Cat: Participation of Forebrain, Brainstem, and Spinal Cord. *Epilepsia*. 29(4):379-388.
- Martínez de Muñoz, D. (1983). El papel de los neurotransmisores en la epilepsia. En *Aminoácidos y Péptidos en la Integración de Funciones Nerviosas*. Pasantes-Morales, H. y Aréchiga, H. UNAM. México, D. F. pp. 189.
- Mazarati, A. M., Halász, E., y Telegdy, G. (1992). Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats. *Brain Research*. 589:164-166.
- McNamara, J. O. (1986). Kindling model of epilepsy. En Delgado-Escueta, A. V., Ward, A. A., Jr., Woodbury, D. M., and Porter, R. J. (eds). *Basic Mechanisms of the Epilepsies (Advances in Neurology, Vol. 44)*. Raven Press. New York. pp. 303-318.
- McIntyre, D. C., and Racine, R. J. (1980). Kindling mechanisms: current progress on an experimental epilepsy model. *Progress in Neurobiology*. 27:1-12.
- Melis, M. and Gale, K. (1983). Effect of Dopamine Agonist on GABA turnover in the Superior colliculus: Evidence that Nigroreticular GABAergic Projections Are Under The Influence Of Dopaminergic Transmission. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 226:425-431.

- Mervyn, J. E. and Tyrer, J. H. (1989). *Anticonvulsant Therapy, Pharmacological basis and Practice*. Churchill Livingstone. London. 31,33-35, 172.
- Morimoto, K., and Goddard, G. V. (1987). The substantia nigra is an important site for containment of seizure generalization in the kindling model of epilepsy. *Epilepsia*. 28:18:1-10.
- Moshé, S. L., Okada, R., and Albala, B. J. (1985). Ventromedial thalamic lesions and seizure susceptibility. *Brain Research*. 377:368-372.
- Nauta, W. J. H. (1986a). *Circuits Connections Linking cerebral Cortex, Limbic System, and Corpus Striatum*. En: *The Limbic System: Funcional Organization and Clinical Disorders*, edited by B. K. Danne and K. E. Livinston. Raven Press, New York. pp. 43-56.
- Nauta, W. J. H. (1986b). *A Simplified Perspective on the Basal Ganglia and Their Relation to the Limbic System*. En: *The Limbic System: Funcional Organization and Clinical Disorders*, edited by B. K. Danne and K. E. Livinston. Raven Press, New York. pp. 67-77.
- Oller, D. L., Oller, F. V. L. y Turner, M. (1983). *Las Epilepsias*. Paidós. Buenos Aires. 12, 28-59.
- Pazdernik, T. L., Cross, R. S., Giesler, M., Samson, F. E., and Nelson, S. R. (1985). Changes in local cerebral glucose utilization induced by convulsants. *Neuroscience*. 14:823-835.
- Poirier, L. J., Giguere, M., and Marchand, R. (1983). Comparative Morphology of the Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area in the Monkey, Cat and Rat. *Brain Research Bull*. 11:371-397.

- Rosenberg, H. C., Tietz, E. I., Zhang, H., and Chiu, T. H. (1990). Tolerance to Diazepam and Methyl- β -carboline-3-carboxylate Measured in Substantia Nigra of Benzodiazepine Tolerant Rats. *Life Sciences*. 46:519-525.
- Rubio, D. F. (1991). Aplicabilidad de Modelos Experimentales de Epilepsia a la Clínica. 17-20.
- Shen, D. D., Levy, R. H., Moor, M. J. , y Savitch, J. L. (1990). Efficacy of stiripentol in the intravenous pentylentetrazol infusion seizure model in the rat. *Epilepsia Research*. 7:40-48.
- Shin, C., Rigsbee, L. C., and McNamara, J. O. (1986). Anti-seizure and anti-epileptogenic effects of γ -vinyl-Aminobutyric acid in amygdaloid kindling. *Brain Research*, 398:370-374.
- Sidman, R. L., Angevine, Jr. J. B., and Taber, P. E. (1971). *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Sokal, R. R., y Rohlf, F. J. (1979). *Biometria. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. Ediciones H. Blume. España. pp. 832.
- Tapia, R. (1991). Alteraciones Neuroquímicas Asociadas a las Epilepsias. En: Brailowsky, S. y Otero-Silficio, E. (eds). *Epilepsia Experimental*. Academia Mexicana de Neurología, A. C., México, D. F. pp.37-45.
- Timothy, A. P. (1992). Classification of Seizures and Epilepsy. In: Stanley, R. R. Jr., y Kutt, H. (eds). *The Medical Treatment of the Epilepsy*. Marcel Dekker, inc. New York. 734.

- Turski, L., E. A. Cavalheiro, M. Schwarz, F. W. A. Turski, L. E. A. De Moraes Mello, Z. A. Bortolotta, T. Klockgether, and K. H. Sontag. (1986). Susceptibility to seizures produced by pilocarpine in rats after microinjection of isoniazid γ -vinyl-GABA into substantia nigra. *Brain Research*, 370:294-309.
- Turski, L., Andrews, J. S., Loschmann, P. A., Bressler, K., Bortolotto, Z. A., Calderazzo-Filho, L. S., and Cavalheiro, E. A. (1990). Substantia nigra regulates action of antiepileptic drugs. *Brain Research*. 520 (1-2): 232-239.
- Vincent, S., Hattori, T., McGeer, E. (1978). The Nigrotectal Projection: A Biochemical and Ultrastructural Characterization. *Brain Research*. 151:159-164.
- Vitorica, J., Park, D., Chin, G., and de Blas, A. L. (1990). Characterization with Antibodies of Gamma-aminobutyric Acid/Benzodiazepine Receptor Complex During Development of the Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*. 54:187-194.
- Zar, H. J. (1974). *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc. USA. pp.620.
- Zhang, H., Rosenberg, H. C., Tietz, E.J., (1989). Injection of benzodiazepine but not GABA or muscimol into substantia nigra suppresses pentylenetetrazol seizures. *Brain Research*. 48 (1-2):73-79.