

1993-B

086384124

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“EVALUACION CONDUCTUAL DEL EFECTO PROTECTOR DE LOS
ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NMDA (N-Metil-D-Aspartato)
EN LAS CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR 4-AP
(4-amino piridina)”.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
MONICA ELISA UREÑA GUERRERO
GUADALAJARA, JAL. ABRIL DE 1994

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección del M. en C. Alberto Morales Villagrán y contando con la asesoría del M. en C. Carlos Beas Zárate.

A MI MADRE:

Ma. del Rosario Guerrero Morales

A MI PADRE:

Sergio Ureña Navarro

A MIS HERMANOS:

Ma. Eugenia, Marissa y Sergio

A MIS CUÑADOS:

Jorge y Ricardo

A MIS SOBRINOS:

Jorge, Luis, Daniel, Ricardo, Melisa y Rosario

Gracias por todo lo que me han dado.

Gracias a todas las personas, amigos, compañeros y familiares que de una u otra forma me han estimulado para seguir superándome, colaborando así en la realización de este trabajo al brindarme su apoyo y ayuda incondicional.

Gracias al M. en C. Alberto Morales Villagrán y al M. en C. Carlos Beas Zárate quienes con su dirección y asesoría enriquecieron la calidad de este trabajo.

INDICE

CONTENIDO	PAG.
Lista de abreviaturas	i
Resumen	iii
Introducción	1
Antecedentes	9
Hipótesis	21
Objetivos	23
Materiales y Métodos	25
Diagrama experimental	33
Resultados	35
Discusión	43
Conclusiones	48
Tablas y Figuras	50
Bibliografía	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE	Aminoácidos excitatorios
AC	Acetilcolina
ADP	Adenosin difosfato
AMPA	Acido propiónico 3-amino-4-hidroxi-5-metil-isoxasol
AP5	Acido 2-amino-5-fosfonovalérico
AP7	Acido 2-amino-7-fosfonohepta-nóico
4-AP	4-amino piridina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosin trifosfato
Ca ⁺⁺	Ión calcio
CGS-19755	Acido cis-4-(fosfonometil)-2-piperidina carboxílico
CPD	Cambio paroxístico despolarizante
CPH	Cambio paroxístico hiperpolarizante
CPP	Acido 3-(2-carboxi-piperazin-4-il)-propil-1-fosfónico
DA	Dopamina
GABA	Acido γ -aminobutírico
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
³ H	Tritio
IC	Intracerebral
ICV	Intracerebroventricular
IE	Intraestriatal
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenosa
K ⁺	Ión potasio
KA	Kainato
Kg	Kilogramo
Mg ⁺⁺	Ión magnesio

.mg	Miligramo
MK801	Dizocilpina
μ l	Microlitro
Na ⁺	Ión sodio
nmol	nanomol
PCP	Penciclidina
Quis	Quiscualato
SC	Subcutánea
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SSF	Solución salina fisiológica
TEA	Tetraetilamonio
UI	Unidades Internacionales
Zn ⁺⁺	Ión zinc

RESUMEN

La 4-amino piridina (4-AP) es un potente convulsionante que incrementa la liberación de diferentes neurotransmisores, entre ellos el glutamato (Glu), lo que conduce a la hiperexcitación neuronal y a la producción de crisis convulsivas. El receptor a Glu tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), parece estar implicado en diferentes alteraciones neuronales, tales como la epilepsia y el daño neuronal, sin embargo, todavía no se conoce con exactitud la función que desempeña en el establecimiento de estas alteraciones. Por lo que se decidió analizar la posible implicación del receptor NMDA en las crisis convulsivas inducidas por 4-AP. Con este propósito se llevó a cabo la caracterización de los cambios conductuales inducidos por la administración intracerebral de 4-AP en ventrículo lateral, cuerpo estriado, corteza motora y área tempestas, así como la evaluación del efecto protector inducido por la utilización de algunos antagonistas del receptor NMDA (MK801, CPP y AP7). La administración de los antagonistas de manera conjunta a la 4-AP no tiene ningún efecto protector a nivel de la latencia de aparición de la hiperexcitabilidad conductual, sin embargo, los antagonistas son capaces de reducir la duración de la hiperexcitabilidad conductual. Todos los antagonistas probados evitan que se presenten las conductas convulsivas más severas, tales como las convulsiones tonico-clónicas, las carreras alocadas y el *status epilepticus*, además disminuyen la frecuencia de presentación de otras conductas convulsivas menos severas, así como el número de animales que las presentan. El efecto protector de cada uno de los antagonistas se modificó según la región en que se administraron los compuestos. Lo anterior sugiere que el receptor NMDA realmente está implicado en el establecimiento de las crisis convulsivas inducidas por 4-AP, posiblemente a nivel de la propagación más que a nivel de la iniciación o la extinción de las mismas.

INTRODUCCION

GENERALIDADES

El sistema nervioso es un conjunto de estructuras funcionalmente especializadas mediante las cuales el organismo responde adecuadamente a los estímulos que recibe, tanto del medio externo como del medio interno. Comúnmente se le divide en: a) Sistema nervioso central (SNC), el cual representa el nivel integrativo, está constituido por el encéfalo y la médula espinal; b) Sistema nervioso periférico (SNP) comprende los nervios espinales y craneales que contienen las prolongaciones de las neuronas aferentes y eferentes, las cuales constituyen el nivel de aferentación y eferentación, respectivamente; y c) Sistema Nervioso Autónomo (neurovegetativo) comprende elementos tanto del SNC como del SNP, se subdivide en parasimpático y simpático e interviene en la regulación de la actividad de las vísceras (1).

Los elementos básicos que componen el sistema nervioso son: 1) células nerviosas (neuronas), 2) células intersticiales (astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann y células satélite) y 3) elementos del tejido conjuntivo (fibroblastos, microglia, vasos sanguíneos y líquido extracelular). Las neuronas y células intersticiales derivan del ectodermo embrionario, mientras que los elementos del tejido conjuntivo derivan del mesodermo.

La neurona constituye la unidad morfológica funcional y ontogénica del sistema nervioso. Desde el punto de vista morfológico cada neurona se encuentra en contacto (sinapsis) con otras neuronas por medio de sus prolongaciones, para constituir un segmento interconector de la red del sistema nervioso. Funcionalmente cada neurona es un elemento integrador, conductor y transmisor de la información codificada. Ontogenéticamente todas las neuronas se desarrollan a partir de un tipo celular primordial llamado neuroblasto (2).

La imagen típica de una neurona comprende un cuerpo celular estrellado (soma o pericarion) con prolongaciones dendríticas y un fino axón que emerge de uno de sus polos. Sin embargo, la neurona es una célula muy polimórfica, cuya clasificación no solo se basa en la forma sino también en su localización y función (3).

La transmisión de impulsos de neurona a neurona se lleva a cabo en la sinapsis, donde generalmente las terminales del axón de una neurona hacen contacto con el soma o las dendritas de otra, sin embargo, el contacto sináptico puede implicar otras partes de la célula nerviosa. En la sinapsis química, los potenciales de acción de la neurona presináptica provocan liberación de sustancias neurotransmisoras o neuromoduladoras desde las vesículas sinápticas hacia el espacio intersináptico (hendidura sináptica), lo que produce o impide cambios en el potencial de membrana de la neurona postsináptica (4).

Cualquier alteración en el mecanismo básico de la sinapsis puede conducir a disfunciones del sistema nervioso. Dentro de estas disfunciones se encuentra la epilepsia, padecimiento que se presenta debido a una hiperexcitación de las células nerviosas.

EPILEPSIA

La epilepsia ha sido uno de los grandes problemas de la humanidad, tanto por su alta incidencia y prevalencia¹, como por sus consecuencias médicas y sociales. Desde tiempos hipocráticos se ha insistido en eliminar la creencia del carácter sobrenatural de la epilepsia, sin embargo, por temor e ignorancia, hasta la fecha, el

¹ Aproximadamente 50'000,000 de personas en el Mundo entero tienen epilepsia y por lo menos, 25% de ellas sufren convulsiones resistentes a las terapias médicas existentes (5)

enfermo epiléptico sigue siendo objeto de discriminación en nuestra sociedad.

Etimológicamente, la palabra *epilepsia* deriva de una preposición y verbo irregular griego, *epilambanein*, que significa: "ser sobrecogido bruscamente". La definición de epilepsia ha provocado polémica entre las diferentes escuelas neurológicas. Por esta razón, en 1973, la Liga Internacional contra la Epilepsia y la Organización Mundial de la Salud publicaron un diccionario de epilepsia en el que se le define como una *afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes, debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas) asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas*. Esta definición ha recibido un reconocimiento prácticamente unánime.

La epilepsia, hasta que no se demuestre lo contrario, debe considerarse como un síndrome que puede presentarse en un importante número de padecimientos del SNC (6). Como todos los síndromes, es producida por causas diversas pero presenta una fisiopatología común, la cual comprende un conjunto de síntomas que denotan disfunción cerebral con cuadros convulsivos paroxísticos intermitentes, reversibles y con una notoria tendencia a recurrir (7).

La característica clínica más importante de la epilepsia es la variabilidad de sus manifestaciones según el sitio de descarga, así como lo impredecible de su presentación y reaparición con períodos asintomáticos que pueden durar minutos, días, meses o años (6).

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

En concreto, la epilepsia se debe a una despolarización excesiva de la membrana de las neuronas epileptogénicas que originan, por un lado, descargas neuronales de alta frecuencia y, por el otro, cambios hiperpolarizantes compensatorios (inhibición) que

tratan de regular esta descarga. Además, la epilepsia se debe a un reclutamiento anormal de las neuronas del conglomerado epiléptico (foco epiléptico) y de las neuronas vecinas (sistema epiléptico), lo que origina una hipersincronía de las descargas neuronales individuales. Así, despolarización-hiperpolarización y descargas neuronales excesivas e hipersincrónicas son la esencia de la actividad convulsiva (7).

La generación de potenciales postsinápticos excitatorios² en las neuronas del foco epiléptico produce el cambio paroxístico despolarizante (CPD), este es un cambio de despolarización repentino y recurrente que promueve la generación de una serie de descargas electroencefalográficas, las cuales son seguidas por un período de hiperpolarización antes de que vuelva a iniciarse un nuevo CPD. Por lo tanto, la hipersincronía de la descarga local se debe a un cambio paroxístico hiperpolarizante (CPH) consecutivo al CPD. La proporción y secuencia alterna entre el CPD y el CPH dan como consecuencia:

1) La generación de espigas electroencefalográficas locales en el foco epiléptico.

2) La generación de impulsos que se propagan a otros sitios del cerebro y a los músculos, donde originan actividades epileptiformes a distancia y contracciones musculares espasmódicas, respectivamente. Cuando los CPD son breves y predominan los CPH se producen espigas electroencefalográficas aisladas, llamadas "interictales" carentes de expresión sintomática, excepto cuando ocurren en la corteza motora. Cuando los CPD son prolongados y los CPH breves se producen espigas electroencefalográficas que dan origen a crisis epileptiformes con las siguientes fases:

a) Fase tónica (espigas de alta frecuencia y de amplitud creciente).

² Tanto el aumento de la actividad presináptica excitatoria como la pérdida o disminución de la actividad presináptica inhibitoria pueden conducir a la generación de potenciales postsinápticos excitatorios.

- b) Fase clónica (espigas de baja frecuencia y amplitud sostenida).
- c) Fase de detención (suspensión brusca de espigas).
- d) Fase de recuperación.

Estas tipo de descargas, denominadas "ictales", se acompañan generalmente de manifestaciones clínicas (7).

MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA

La limitación natural que existe al intentar estudiar la epilepsia en humanos mediante técnicas invasivas o ensayos farmacológicos, ha creado la necesidad de buscar modelos experimentales de epilepsia que semejen a la epilepsia humana (8).

Existen múltiples preparaciones animales que se utilizan para producir crisis convulsivas. Las crisis producidas con tales preparaciones deben ser recurrentes, episódicas y asociadas con un patrón electroencefalográfico anormal, repetitivo y de alto voltaje; controlables con anticonvulsionantes clínicamente efectivos; y donde los animales esten libres, hasta donde sea posible, de otras alteraciones neurológicas que pudieran causar complicaciones. Hasta ahora ningún modelo experimental se ha configurado según estos criterios; pese a ello, numerosos modelos continuan aportando información valiosa en los aspectos relativos a los factores sistémicos como elementos de variación de umbrales convulsivos (9).

Para desarrollar un modelo experimental de epilepsia, generalmente se eligen mamíferos que presenten manifestaciones eléctricas y conductuales similares a las de la epilepsia humana. Dado que la conducta animal y la humana tienen considerables diferencias muchas veces no es posible evaluar satisfactoriamente las manifestaciones conductuales en los modelos experimentales de epilepsia, sobre todo si hay ausencia de actividad motora. En estos casos, el criterio principal está dado por la identificación de las manifestaciones eléctricas del sistema nervioso.

Un modelo experimental se considera como *modelo de epilepsia verdadera* cuando las alteraciones paroxísticas son "espontáneamente" recurrentes. Los modelos de epilepsia verdadera más estudiados son: el provocado por estimulación eléctrica repetitiva y subumbral (kindling) y los inducidos por aplicación tópica de crema de alúmina o polvo de cobalto en la corteza cerebral. Sin embargo, existe una gran variedad de modelos experimentales en los que no es posible inducir, en forma aguda, un número variable de crisis convulsivas apreciables ni conductual ni electrofisiológicamente. Dado que estos modelos no son espontáneamente recurrentes y, por tanto, no son crónicos, es más apropiado denominarlos *modelos experimentales de crisis epileptiformes*.

El estudio controlado y sistematizado de los modelos experimentales de epilepsia tiene tres aplicaciones fundamentales:

a) En el ensayo de drogas anticonvulsivas que pudieran tener una aplicación efectiva en la terapéutica de la epilepsia en humanos.

b) En el estudio de los mecanismos neuronales básicos implicados en la generación de crisis epilépticas, sean o no convulsionantes.

c) En el estudio de los mecanismos neuronales que en condiciones normales se relacionan con la regulación de la excitabilidad en el SNC (8).

Administración sistémica de sustancias convulsionantes.

La administración de sustancias convulsionantes por vía sistémica es un procedimiento frecuentemente empleado en los estudios experimentales de epilepsia. En estos modelos los cambios paroxísticos producidos no son espontáneamente recurrentes, por lo que se consideran como modelos experimentales de crisis epileptiformes.

El procedimiento que se sigue para producir las crisis convulsivas en estos modelos, consiste en administrar el agente convulsionante por vía intraperitoneal (IP), intravenosa (IV) o

subcutánea (SC) a una dosis convulsionante máxima o a una dosis efectiva media, según sea el objeto de estudio.

La administración de la sustancia convulsionante por vía sistémica permite su distribución homogénea en la red de capilares sanguíneos cerebrales, por lo que su acceso al parénquima cerebral queda condicionado por las características regionales de la permeabilidad capilar al agente químico en estudio. Esta disponibilidad, casi homogénea, del convulsionante en el sistema nervioso parece ser de gran utilidad para los estudios de carácter neuroquímico (8).

Dentro de los modelos experimentales de crisis epileptiformes inducidos por la aplicación sistémica de sustancias convulsionantes se encuentran los de pentilentetrazol, glutamato monosódico, bicuculina, estriknina, rojo de rutenio y 4-amino piridina, entre otros.

Aplicación tópica de sustancias irritantes.

La aplicación de sustancias irritantes sobre la corteza cerebral tiene la ventaja de que el proceso epiléptico se induce en una zona restringida del sistema nervioso. Generalmente, la aplicación del inductor produce actividad paroxística en forma aguda y el grado de severidad depende de la cantidad de sustancia que se aplique. Frecuentemente, se utilizan animales anestesiados o inmovilizados, un aspecto muy importante es que el animal no experimente sensación dolorosa. Los modelos de aplicación tópica de sustancias irritantes de manera crónica ofrecen mayores semejanzas con la epilepsia humana (8).

Las sustancias irritantes que más se han empleado en la inducción del proceso epiléptico por aplicación tópica son: penicilina, crema de alúmina, cobalto, picrotoxina y ácido kaínico, entre otros.

ANTECEDENTES

EL GLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISOR

En la actualidad, existe el conocimiento generalizado de que ciertos aminoácidos actúan como importantes mediadores de la transmisión nerviosa. Por su implicación en la regulación de la excitabilidad en el SNC, cuatro de ellos han sido ampliamente estudiados: ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina (Gly), glutamato (Glu) y aspartato (Asp) (10). El Glu y el Asp tienen un potente efecto excitatorio sobre las neuronas del SNC, en contraste con el efecto altamente depresor de sus respectivos productos de α -descarboxilación, β -alanina y GABA (11).

La propuesta inicial de que el Glu podría ser el principal neurotransmisor excitatorio data de la década de los sesentas, pocos años después de que el GABA fuera aceptado como el principal neurotransmisor inhibitorio (12). Con anterioridad se había reconocido que la concentración de Glu en el cerebro excede a la que existe en los demás tejidos, esto hizo suponer que desempeñaba una función importante, pero más que nada como una molécula clave en el metabolismo cerebral o como compensatorio en la deficiencia aniónica del cerebro (13), no como neurotransmisor. Fueron, entonces, de gran importancia los trabajos que demostraron que el Glu tenía un potente efecto excitatorio al aplicarse externamente en la mayoría de los centros neuronales (11), concediéndosele por tanto una probable función neurotransmisora.

Para considerar una sustancia como neurotransmisor debe sintetizarse en la célula nerviosa, almacenarse en la terminal presináptica, liberarse en cantidades suficientes para ejercer un efecto sobre la célula postsináptica, recapturarse o removerse del espacio intersináptico para terminar con su efecto y al aplicarse exogenamente debe tener el mismo efecto que el transmisor endógeno (14). La información recopilada desde los años setentas indica que el Glu es el principal neurotransmisor que media la transmisión

excitatoria en el SNC de mamíferos, a través de la activación de canales iónicos (15, 16).

SINTESIS

El Glu es un aminoácido no esencial incapaz de penetrar al cerebro debido a su poca permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica en la dirección sangre-cerebro, esto hace que el Glu deba ser sintetizado en el cerebro, a partir de α -cetoglutarato, ornitina o glutamina (Gln) (17). Los experimentos con precursores marcados han demostrado que la mayor parte del Glu que actúa como neurotransmisor es sintetizado a partir de Gln (14). Las células gliales desempeñan una función importante en la interconversión de Glu a Gln, recapturan el Glu del espacio intersticial y lo convierten en Gln por acción de la glutamina sintetasa, esta Gln es secretada por las células gliales y recapturada por las neuronas glutamatérgicas, donde la glutaminasa la convierte en Glu (18). Dentro de las terminales nerviosas glutamatérgicas el Glu se transporta al interior de vesículas por un proceso dependiente de ATP (14) (Fig. 1).

LIBERACION Y RECAPTURA

El Glu puede ser liberado de la terminal presináptica a través de dos mecanismos diferentes, uno independiente de la concentración intracelular de Ca^{++} por cotransporte reverso de la recaptura de sodio Na^+ desde el citoplasma a través de la membrana celular y otro dependiente de Ca^{++} desde un almacén específico del transmisor a través de vesículas una vez que se incrementa la concentración citosólica de Ca^{++} (19) estos dos mecanismos pueden ser claramente distinguidos mediante el empleo de fluorometría continua, la cual permite monitorear la liberación del aminoácido y el influjo de Ca^{++} a la terminal nerviosa (20) (Fig. 1).

Una disminución en la proporción citosólica de ATP/ADP puede acelerar la liberación de Glu por cualquiera de sus dos mecanis-

mos. La liberación independiente de Ca^{++} puede incrementar como resultado de una falla en la $\text{ATPasa-Na}^+-\text{K}^+$, lo que conduce a una disminución del gradiente de Na^+ a través de la membrana, incrementándose el cotransporte reverso Na^+-Glu (21). La concentración intracelular de Ca^{++} libre puede incrementarse por alteración de la ATPasa-Ca^{++} , este incremento conduce a la liberación de Glu dependiente de Ca^{++} (19).

El Glu liberado al espacio intersináptico se remueve a través de un mecanismo de recaptura de alta afinidad dependiente de Na^+ (22). La dependencia de Na^+ es absoluta, requiriéndose dos iones Na^+ para recapturar una molécula de Glu (23). La recaptura de Glu llevada a cabo por las células gliales es probablemente el mecanismo más importante para la inactivación del neurotransmisor (24) (Fig. 1).

RECEPTORES

El efecto excitatorio ejercido por el Glu sobre la célula postsináptica está mediado por su interacción con varios subtipos de receptores, comunmente clasificados en receptores tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato) y tipo no-NMDA, de acuerdo a su respuesta preferencial a análogos del Glu que actúan como agonistas de cada receptor. Los receptores tipo no-NMDA se dividen en receptor a quisqualato (Quis) o al ácido propiónico 3-amino-4-hidroxi-5-metil isoxasol (AMPA) y receptor a kainato (KA) (25, 26). La activación de estos receptores induce la apertura de canales iónicos a cationes, lo que lleva a la despolarización de la terminal postsináptica (27, 28) (Fig. 2).

Un grupo de receptores a Quis, descritos como metabotrópicos, desencadenan la producción de segundos mensajeros a través de la activación de una Fosfolipasa C, la cual cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol (29).

Receptor NMDA.

El receptor NMDA es un complejo macromolecular constituido por cinco subunidades proteicas heteroméricas que atraviesan la membrana (30). Está acoplado a un canal catiónico permeable a Ca^{++} , Na^+ y K^+ , es sensible a voltaje (31, 32) y cuenta con múltiples sitios de regulación farmacológica entre los que se encuentra el sitio de reconocimiento para el neurotransmisor, los sitios dentro del canal, el sitio de unión a Gly, el sitio de unión al Zn^{++} y los sitios moduladores de poliaminas (33, 34) (Fig. 3).

El sitio de reconocimiento al neurotransmisor no sólo es activado selectivamente por el Glu o por su análogo sintético, el NMDA, sino también por otros aminoácidos excitatorios endógenos como el Asp, homocistato y quinolinato (35, 36). Además, sobre este sitio interactúan otros ligandos como el AP5 (ácido 2-amino-5-fosfonovalérico), el AP7 (ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico), el CGS-19755 (ácido cis-4-(fosfometil)-2-piperidina-carboxílico) y el CPP (ácido 3-(2-carboxi-piperazin-4-il)propil-1-fosfónico), compuestos que han demostrado ser los antagonistas más potentes y selectivos del NMDA (37, 38, 39, 40).

El Mg^{++} , bloquea el efecto excitatorio de los agonistas al receptor NMDA (14), mediante su unión a un sitio dentro del canal catiónico asociado al receptor (41). Este bloqueo ocurre a concentraciones extracelulares de Mg^{++} normales y es sensible a voltaje. Cuando una neurona es significativamente despolarizada, el bloqueo por Mg^{++} se elimina (42, 43), lo que hace suponer que el bloqueo ejercido por Mg^{++} es un mecanismo de regulación fisiológica de la activación del receptor NMDA (34). Otros compuestos como la fenciclidina (PCP), la ketamina y el MK801 (dizocilpina) también actúan como bloqueadores del receptor NMDA al interactuar con sitios dentro del canal, una vez que el receptor ha sido activado (44). De esta serie de compuestos el MK801 ha demostrado ser el antagonista no competitivo del NMDA más potente (45, 46). El efecto antagónico

producido por el MK801 además de ser no competitivo se caracteriza por ser dependiente de la dosis utilizada y del voltaje (44).

Los estudios realizados en neuronas cultivadas utilizando la técnica de patch-clamp, demostraron que la Gly potencia la respuesta del receptor NMDA a sus agonistas, a través de un incremento en la frecuencia de apertura del canal (47). El sitio de unión a Gly, se localiza en la cara externa del receptor NMDA, es de alta afinidad e insensible a estriquina (34), lo que lo diferencia del sitio de unión a Gly con efecto inhibitorio de las regiones superiores del SNC, tales como la corteza cerebral (48). El efecto potenciador que ejerce la Gly sobre el receptor NMDA es antagonizado selectivamente por el ácido 7-clorokinurénico (49) y mimetizado por serina y fenilalanina (33).

El ión Zn^{++} también produce un bloqueo selectivo de la respuesta originada por el NMDA, atenúa la activación del receptor NMDA de manera dependiente de la dosis y no exhibe dependencia del voltaje (50, 51). La despolarización inducida por K^+ en rebanadas hipocámpales puede liberar suficiente Zn^{++} para interactuar con el receptor NMDA (52), lo que puede constituir un mecanismo de modulación entre la liberación de Glu y la activación del receptor. El Zn^{++} no tiene ningún efecto sobre la unión de Glu sensible a NMDA (53), pero puede reducir la unión de ligandos al canal (54). Además, el Zn^{++} inhibe la unión de Gly, lo que permite proponer que la liberación sináptica de Zn^{++} puede reducir la influencia tónica excitatoria de la Gly (55).

Los estudios realizados sobre la modulación de la unión del MK801- $[^3H]$ demuestran que las poliaminas incrementan esta unión cuando se induce por Glu y Gly (56). La espermina y la espermidina actúan como agonistas de este efecto, mientras que la putrescina y la arcaína actúan como antagonistas (57). Sin embargo, todavía

no se ha localizado el sitio de unión preciso de las poliaminas en el receptor NMDA.

Implicaciones funcionales

El receptor NMDA ha sido ampliamente estudiado debido a su implicación funcional en la plasticidad neuronal, en el aprendizaje y la memoria; en la transmisión sensorial; y en el control de la respiración y de la presión sanguínea (34). Además, participa en el establecimiento de algunas alteraciones neurológicas, tales como el daño cerebral isquémico, el daño neuronal hipoglucémico, la epilepsia, las alteraciones motoras y la atrofia olivopontocerebelar (34). Su implicación en estas alteraciones es lo que ha impulsado el desarrollo de antagonistas cada vez más potentes y selectivos, como posibles medidas terapéuticas. Mientras que los receptores no-NMDA median la respuesta sináptica excitatoria rápida (58) y sus agonistas, especialmente el KA, potencian la liberación de Glu (14). Durante el desarrollo postnatal los antagonistas del receptor AMPA/QUIS protegen efectivamente contra el daño neuronal inducido por el efecto excitotóxico del Glu, mientras que los antagonistas del receptor a KA son más efectivos en neuronas maduras (59). Además, la administración sistémica de KA produce crisis límbicas y alteraciones neurológicas similares a las observados en la epilepsia temporal humana (60). Estas evidencias entre otras destacan la participación de los receptores no-NMDA en las crisis convulsivas y en la neurotoxicidad inducidas por Glu.

PRINCIPALES VIAS GLUTAMATERGICAS

Los estudios inmunoquímicos y neuroquímicos sugieren que la mayoría de las vías glutamatérgicas son aferencias que se proyectan desde y hacia la corteza cerebral y el hipocampo. Esas vías incluyen la cortico-estriatal, la cortico-hipocampal, la cortico-cortical, la entorrinal-hipocampal y las hipocampales y corticales que se dirigen hacia los núcleos hipotalámicos, talámicos y del tallo cerebral. Además, en el cerebelo existe una alta densidad de receptores a Glu y las células granulares de la corteza cerebelosa

parecen ser esencialmente glutamatérgicas (17) (Fig. 4).

El Glu liberado por las neuronas glutamatérgicas interactúa con otros sistemas de neurotransmisión que convergen en los blancos de estas aferencias. Esto sucede por ejemplo en el cuerpo estriado, el cual recibe múltiples inervaciones glutamatérgicas desde la corteza cerebral (vía cortico-estriatal) que influyen sobre la liberación estriatal de dopamina (DA), acetilcolina (AC), GABA y serotonina (61)

GLUTAMATO Y EPILEPSIA

Un desbalance entre las aferencias excitatorias e inhibitorias que llegan a un grupo de neuronas, en favor de la excitación, conduce a la hiperexcitabilidad neuronal, la cual puede dar origen a las manifestaciones clínicas de la epilepsia (62) (Fig. 5). Evidencias experimentales sugieren que el Glu desempeña una función importante en la fisiopatogénesis del daño neuronal ocasionado por el *status epilepticus* y la epilepsia crónica (59). Los aminoácidos excitatorios (AAE), como el Glu y el Asp son potentes convulsionantes y la inyección local de sus agonistas así como la estimulación de las aferencias aminoacidérgicas excitatorias, producen un patrón de cambios morfológicos agudos y crónicos en el cerebro que son similares a los cambios encontrados en pacientes con epilepsia (63, 64). Además los antagonistas de los receptores a AAE poseen propiedades anticonvulsionantes y previenen los cambios morfológicos asociados con las convulsiones (65). En estudios electroencefalográficos realizados en rebanadas de cerebro se ha observado que las descargas epileptiformes que resultan de la reducción en la inhibición GABAérgica son sensibles tanto a antagonistas del receptor NMDA (hipocampo, corteza entorrinal, neocorteza) como a antagonistas de los receptores no-NMDA (neocorteza) (66). Además, se ha propuesto que los receptores a AAE pueden participar en la formación de focos epilépticos en el cerebro, debido a que los antagonistas de estos receptores inhiben el desarrollo

de convulsiones espontáneas y los cambios neuroquímicos producidos normalmente durante el "kindling"³ (68).

4-AMINO PIRIDINA

La 4-amino piridina (4-AP) es un potente convulsionante, cuya administración aguda por vía IP o intracerebral (IC) es capaz de inducir crisis convulsivas en diferentes especies de mamíferos (69). Las crisis convulsivas inducidas por 4-AP se deben a un incremento en la liberación de neurotransmisores de manera general e inespecífica (70), lo que conduce a la pérdida del equilibrio excitación-inhibición, de manera similar a lo que ocurre en la epilepsia (62). Debido a que la 4-AP genera efectos excitatorios tanto en preparaciones nerviosas como musculares, se ha utilizado ampliamente como una herramienta para el estudio de los mecanismos que conducen a la excitación celular.

Estudios *in vitro* han permitido observar que el efecto de la 4-AP sobre la liberación de neurotransmisores es de amplio espectro, es decir, es independiente de la sustancia mediadora, tipo de sinapsis o especie (71). En la unión neuromuscular, la 4-AP potencia la liberación de acetilcolina (AC) inducida por estimulación eléctrica (72), evita la disminución de la fosfatidilcolina de membranas cuando se estimula de manera sostenida la liberación de AC (73), elimina el efecto inhibitorio de la toxina botulínica (74) y de algunos antibióticos sobre la liberación de AC (75), inhibe ligeramente la actividad de la acetilcolinesterasa (76) y ejerce un efecto potenciador de la recaptura de colina (77). En sinaptosomas de cerebro de ratón la 4-AP produce un aumento en la liberación espontánea de GABA, Glu y AC (78), mientras que en rebana-

³ Modelo experimental de epilepsia en el cual las convulsiones son inducidas gradualmente mediante la estimulación eléctrica supramáxima diaria en diferentes regiones del cerebro (67).

das y sinaptosomas estriatales induce un aumento significativo sobre la liberación espontánea de DA (79) y AC (80). En preparaciones musculares la 4-AP aumenta la excitabilidad eléctrica de la membrana y la actividad mecánica espontánea (81) y prolonga la duración del potencial de acción (82). En terminales nerviosas la 4-AP incrementa la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios, así como la duración de las espigas electroencefalográficas inducidas por estimulación eléctrica (83). En rebanadas de hipocampo la 4-AP genera por un lado grandes potenciales hiperpolarizantes y por otro despolarización de largo término, debido posiblemente a su acción sobre interneuronas GABAérgicas con activación de los receptores GABA_A y GABA_B, respectivamente (84). En médula espinal la 4-AP potencia tanto la transmisión sináptica excitatoria como la inhibitoria (85). En diferentes preparaciones de tejido cerebral la 4-AP es capaz de inducir actividad eléctrica epileptiforme (86). Además, la 4-AP parece modular su efecto excitatorio regulando la fosforilización de ciertas proteínas de membrana implicadas en la liberación de neurotransmisores, induciendo una disminución en la fosforilación de la cinasa II dependiente de Ca⁺⁺/calmodulina lo que favorece su activación y su efecto sobre la sinapsina para facilitar la liberación de neurotransmisores (87).

Los estudios *in vivo* de la 4-AP han permitido confirmar su efecto estimulatorio sobre la liberación espontánea de diversos neurotransmisores. La parálisis flácida inducida por rojo de rutenio es antagonizada efectivamente por la 4-AP, lo que evidencia su efecto sobre la potenciación de la liberación de AC en la unión neuromuscular (88). En animales con libre movimiento mediante microdiálisis cerebral la 4-AP incrementa la liberación de diversos neurotransmisores, entre ellos la AC (89). El patrón de crisis convulsivas inducidas por 4-AP es similar al inducido por la administración IC de ácido kaínico correspondiente a las crisis límbicas (60, 90). La administración sistémica de 4-AP induce un período

convulsivo largo, con una etapa inicial de hiperexcitación, seguida de convulsiones clónicas, convulsiones tónicas y muerte durante una convulsión tónica en algunos animales, mientras que los que sobreviven presentan movimientos clónicos alternados frecuentemente con contracciones tónicas de mediana intensidad (*status epilepticus*). La dosis media convulsiva de 4-AP capaz de inducir crisis varía dependiendo de la especie con que se trabaje (91).

Los mecanismos mediante los cuales la 4-AP ejerce sus efectos excitatorios no se han establecido, pero se conoce que incrementa la entrada de Ca^{++} a la terminal nerviosa (92) y que actúa como bloqueador de la conductancia a K^+ (71, 93). Se ha propuesto que el incremento en la concentración intracelular de Ca^{++} puede ser una consecuencia del bloqueo de K^+ , el cual conduce a la prolongación del potencial de acción, a través de un retardo en la fase de repolarización celular, fenómeno que mantiene los canales de Ca^{++} sensibles a voltaje abiertos (94). Sin embargo, evidencias experimentales han demostrado que la 4-AP incrementa la recaptura de Ca^{++} de manera independiente del bloqueo de la conductancia de K^+ , ya que las concentraciones de 4-AP requeridas para activar el influjo de Ca^{++} son mil veces menores que las requeridas para bloquear la conductancia de K^+ (95). Además, compuestos como el tetrailamonio (TEA) que también bloquean la conductancia de K^+ no ejercen el mismo efecto que la 4-AP sobre el influjo de Ca^{++} , pues se ha observado que en preparaciones del ganglio cervical superior la 4-AP y no el TEA, incrementa la duración del potencial de acción, efecto que se relaciona con una disminución de la concentración extracelular de Ca^{++} (96).

La implicación del sistema glutamatérgico en los efectos excitatorios inducidos por 4-AP se ha demostrado mediante la utilización de algunos antagonistas del Glu, los cuales atenúan o terminan con estos efectos. Las descargas epileptiformes provocadas por 4-AP, se reducen significativamente por efecto del AP5,

compuesto que actúa como antagonista al receptor NMDA, sin embargo, el AP5 no tiene ningún efecto protector sobre las descargas epileptiformes inducidas por otros bloqueadores de la conductancia a K^+ , como el TEA (97). La disminución en el grado de fosforilación de la cinasa II dependiente de Ca^{++} /calmodulina estimulada por 4-AP también es revertida por acción del AP5 (87). Las conductas convulsivas severas inducidas por la administración intrahipocampal de 4-AP son prácticamente eliminadas cuando se administran de manera conjunta antagonistas al receptor NMDA, tales como el CPP, AP7 y MK801 (98). El aumento en la activación de la cinasa C neuronal estimulado por 4-AP también se reduce por efecto de algunos antagonistas al NMDA (99). Además, se ha sugerido que la generación y potenciación de los potenciales postsinápticos excitatorios, efectos ejercidos por la 4-AP, dependen de la activación de los receptores a AAE (62).

Además de los antagonistas al NMDA, la taurina (70), algunos bloqueadores de la conductancia a Ca^{++} , como el fluspirileno (97) y de la conductancia a Na^+ , como la tetrodotoxina (80), también antagonizan los efectos excitatorios inducidos por la 4-AP en diferentes preparaciones nerviosas.

HIPOTESIS

Si el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC que se libera durante las crisis convulsivas y si la activación de su receptor tipo NMDA está implicada en la hiperexcitación neuronal, luego entonces, los antagonistas a este receptor disminuirán la severidad de las crisis convulsivas inducidas por la administración intracerebral de 4-amino piridina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar conductualmente el efecto protector de algunos antagonistas del receptor tipo NMDA en las crisis convulsivas inducidas por administración intracerebral de 4-AP.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Seleccionar la dosis de 4-AP capaz de producir actividad convulsiva conductualmente evaluable al administrarse en las siguientes regiones del cerebro: ventrículo lateral, estriado, corteza motora y área tempestas.

2. Caracterizar los cambios conductuales producidos por la administración intracerebral de 4-AP en las diferentes regiones cerebrales a trabajar.

3. Evaluar el efecto de los antagonistas del receptor tipo NMDA (CPP, AP-7 y MK-801) sobre los cambios conductuales inducidos por la administración de 4-AP.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 200-300g de peso, las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio (ciclos luz-oscuridad 12x12, temperatura constante de 18-22°C y humedad relativa del 40%), con libre acceso al agua y al alimento durante todo el proceso experimental.

La administración IC de las drogas se realizó mediante la cirugía estereotáxica, proceso que se explica a continuación.

CIRUGIA ESTEREOTAXICA

El instrumento estereotáxico es un dispositivo mecánico que permite fijar al animal de experimentación y localizar las regiones cerebrales deseadas mediante un sistema de coordenadas, las cuales deben ser consultadas en un atlas estereotáxico del cerebro.

Para la realización de las cirugías estereotáxicas se procedió a anestésiar al animal en una cámara donde el aire circulante contenía el anestésico volátil halotano. Después de cinco minutos, el animal anestesiado se montó en el aparato estereotáxico, donde una vez inmovilizado siguió recibiendo anestésico hasta el término de la cirugía. Posteriormente, se afeitó la parte superior de la cabeza, se limpió la zona afeitada y se realizó una incisión en el cuero cabelludo de aproximadamente 15-20 mm de largo, sobre la línea media de la cabeza. El tejido conjuntivo perióstico que se encuentra adherido al cráneo se removió mediante un raspado con la parte posterior de la navaja del bisturí. Esto se hizo con el objeto de dejar expuestas las suturas craneales y visualizar el bregma, sutura craneal que se tomó como punto de referencia para localizar las regiones cerebrales deseadas. El bregma se encuentra en la parte superior del cráneo y representa la intersección de las placas frontal y parietal en la línea media.

Inyección estereotáxica.

Después de visualizar las suturas craneales, se instaló en la columna del instrumento estereotáxico una microjeringa, ésta se trasladó hasta quedar encima del bregma, punto a partir del cual la columna se desplazó en dirección anteroposterior y lateral de acuerdo a las coordenadas indicadas para cada región (Cuadro 1). Posteriormente, se realizó un trépano de paredes lisas en el cráneo de la rata, exactamente en el punto final sobre el cual quedó la microjeringa después de haber sido desplazada. El barreno se realizó cuidadosamente, sin tocar la superficie del encéfalo. Entonces, se introdujo lentamente la microjeringa hasta la coordenada dorsoventral correspondiente (Cuadro 1), tratando de ocasionar el menor daño tisular posible. Finalmente, se realizó la inyección de la solución, lentamente y de manera continua para lograr una buena absorción de la solución por parte del tejido.

Después de la inyección, la microjeringa se retiró lentamente y el anestésico dejó de suministrarse, se suturó al animal y se desplazaron las barras fijadoras. El animal se mantuvo sobre la plataforma del instrumento estereotáxico durante algunos minutos mientras se recuperó de la anestesia, enseguida se colocó en su caja para observar los cambios conductuales producidos por la solución administrada.

Implantación estereotáxica.

Después de montar al animal en el instrumento estereotáxico y de visualizar el bregma, se instaló en la base de la columna estereotáxica una pequeña cánula, la cual se tomó como guía de coordenadas. La cánula se desplazó hasta el punto de implantación, se realizó un pequeño trépano y se introdujo hasta un mm menos de la coordenada dorsoventral correspondiente (Cuadro 1), fijándose al cráneo con un poco de cemento dental. Posteriormente, se implantaron tres pequeños tornillos en el área circundante a la cánula para proporcionarle un sostén al capuchón de cemento dental que se construyó sobre el cráneo ocupando toda el área de incisión. El

anestésico dejó de suministrarse cuando solidificó el cemento dental. El animal permaneció en la plataforma estereotáxica hasta que se recuperó por completo y durante este lapso se le administró una dosis de penicilina de 100,000 UI para evitar infecciones postquirúrgicas.

Al día siguiente se procedió a administrar las drogas, mediante una aguja dental que se conectó a la microjeringa y que se introdujo a través de la cánula hasta el punto exacto de inyección (Cuadro 1). Posteriormente, el animal se transfirió a una caja para observar los cambios conductuales producidos por la solución administrada.

Una vez realizada la evaluación de los cambios conductuales inducidos en cada uno de los animales, se procedió a sacrificarlos, se obtuvo el cerebro y se confirmó la administración del compuesto en el lugar deseado.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES

Las drogas utilizadas fueron disueltas en solución salina fisiológica (SSF). En las soluciones se agregó el colorante azul directo, con la finalidad de identificar el sitio de administración del compuesto en el cerebro, por lo que tuvo que manejarse un grupo testigo al que solamente se le administró el vehículo de las soluciones (SSF-colorante).

LOCALIZACION ESTEREOTAXICA DE LAS REGIONES CEREBRALES

La administración de las soluciones se llevó a cabo en el hemisferio cerebral derecho, en cuatro regiones: ventrículo lateral, cuerpo estriado, corteza motora y área tempestas. Regiones que se seleccionaron debido a su participación en la regulación de la conducta motora y en el proceso convulsivo, es decir, en la iniciación, propagación y/o extinción de las crisis convulsivas. La localización de las regiones cerebrales se hizo mediante la utilización del Atlas Estereotáxico de la Rata de Paxinos y Watson

(100). Las coordenadas de trabajo utilizadas para cada una de estas regiones se muestran en el Cuadro 1.

C U A D R O 1

Coordenadas utilizadas para la localización estereotáxica de las regiones cerebrales a trabajar

REGION CEREBRAL	ANTEROPOSTERIOR (mm)	LATERAL (mm)	DORSOVENTRAL (mm)
VENTRICULO LATERAL	+0.8	-1.7	-3.5
CUERPO ESTRIADO	+1.7	-2.7	-5.5
CORTEZA MOTORA	-2.0	-3.0	-1.5
AREA TEMPESTAS	+4.0	-3.5	-6.0

En todos los casos el bregma se tomó como punto de referencia para la localización de las regiones cerebrales. La barra de los incisivos para ventrículo lateral, cuerpo estriado y corteza motora se colocó 3-3.5 mm debajo del cero, mientras que para el área tempestas se colocó 5 mm arriba del cero.

PROCESO EXPERIMENTAL

El proceso experimental general para cada una de las regiones cerebrales elegidas comprendió tres etapas. Primero se seleccionó una dosis de 4-AP capaz de inducir actividad convulsiva conductualmente evaluable, una vez establecida esta dosis, se procedió a evaluar los cambios conductuales inducidos por la administración de 4-AP y por último se evaluó el efecto protector de los antagonistas al receptor NMDA sobre las crisis convulsivas inducidas por 4-AP.

Los antagonistas tipo NMDA utilizados fueron: MK801, CPP y

AP7, los cuales se administraron por vía IC, en dosis subtóxicas que han demostrado ser efectivas en otros modelos experimentales de epilepsia. Debido a la capacidad que posee el MK801 para atravesar la barrera hematoencefálica con facilidad, también se administró por vía IP, 30 minutos antes que el convulsionante para permitir su difusión al cerebro.

Para todas las regiones cerebrales a trabajar se formaron cinco grupos testigo, a los cuales se les administró: SSF-colorante(IC) y los antagonistas MK801(IP), MK801(IC), CPP(IC) y AP7(IC), en las mismas dosis en que se aplicaron para evaluar su efecto protector sobre las crisis convulsivas inducidas por 4-AP. También se formaron cinco grupos experimentales a los cuales se les administró: 4-AP(IC), 4-AP(IC) + MK801(IP), 4-AP(IC) + MK801(IC), 4-AP(IC) + CPP(IC) y 4-AP(IC) + AP7(IC) (ver Diagrama Experimental). El número de animales que se manejó en cada grupo experimental fluctuó de 6 a 13, mientras que los grupos testigo sólo se utilizaron 3 animales (Cuadro 2).

C U A D R O 2

Número de animales incluidos en cada grupo experimental

GRUPO	VL	REGIONES		
		CE	CM	AT
4-AP (IC)	13	8	7	6
4-AP (IC) + MK801 (IP)	6	6	6	6
4-AP (IC) + MK801 (IC)	6	6	6	6
4-AP (IC) + CPP (IC)	6	7	6	6
4-AP (IC) + AP7 (IC)	8	6	6	6

Abreviaturas: VL, ventrículo lateral; CE, cuerpo estriado; CM, corteza motora; y AT, área tempestas.

Las drogas se administraron en diferentes dosis en cada una de las regiones cerebrales seleccionadas (Cuadro 3). En ventrículo lateral y cuerpo estriado las drogas se administraron mediante inyección estereotáxica, mientras que en corteza motora y área tempestas se administraron mediante la implantación de una cánula. En todas las regiones la administración intracerebral de los antagonistas se realizó de manera conjunta con la 4-AP en la misma región, excepto en lo que se refiere al cuerpo estriado para el cual la 4-AP se administró por vía intraestriatal (IE), mientras que los antagonistas al NMDA se administraron por vía intracerebroventricular (ICV). El volumen de inyección en ventrículo lateral fue de 5 μ l, en cuerpo estriado y corteza motora fue de 1 μ l y en área tempestas fue de 0.5 μ l.

C U A D R O 3

Dosis utilizadas de las drogas para cada una de las regiones

TRATAMIENTO	VL	REGIONES			UNIDADES DE DOSIFICACION
		CE	CM	AT	
4-AP (IC)	75	75	75	50	nmol
MK801 (IP)	0.1	0.2	0.2	0.2	mg/Kg
MK801 (IC)	10	10	10	10	nmol
CPP	2	2	10	10	nmol
AP7	10	10	10	10	nmol

Abreviaturas: VL, ventrículo lateral; CE, cuerpo estriado; CM, corteza motora; y AT, área tempestas.

PARAMETROS EVALUADOS

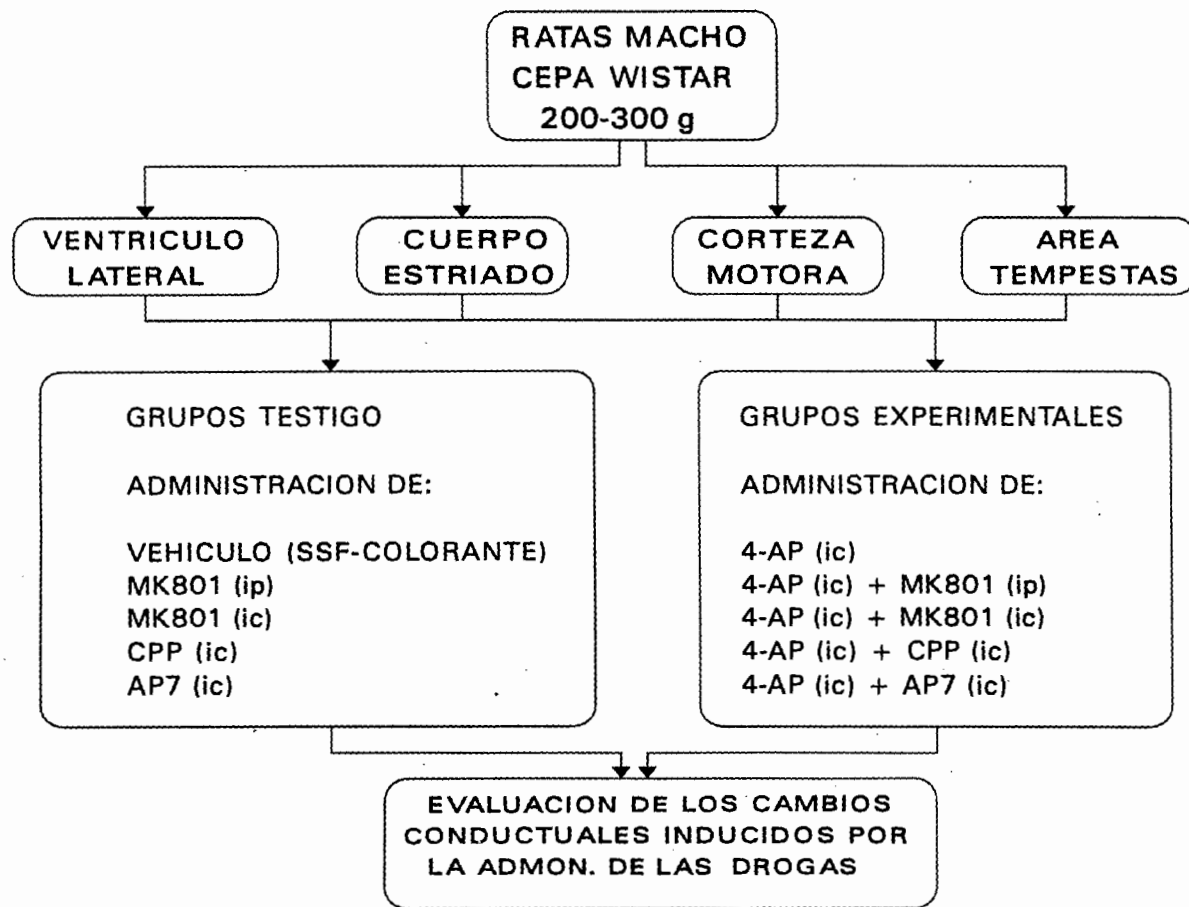
En cada uno de los grupos experimentales de todas las regiones cerebrales manejadas se evaluaron los siguientes parámetros: 1) latencia de hiperexcitabilidad conductual en minutos; 2) duración de hiperexcitabilidad conductual en minutos (período convul-

sivo); 3) frecuencia y porcentaje de individuos que presentaron las siguientes conductas: mioclonos faciales, movimientos masticatorios, convulsiones clónicas de las extremidades delanteras y levantamiento del cuerpo con caída lateral ("rearing"), sacudidas de perro mojado (wet dog shakes), salivación, sacudidas de la cabeza, levantamiento de la cabeza, convulsiones clónicas, giros contralaterales, giros de barril, convulsiones tonico-clónicas generalizadas, carreras alocadas (wild running) y *status epilepticus*. La frecuencia conductual se expresa como número de veces que se presentó la conducta a lo largo del período convulsivo, es decir, eventos por período convulsivo (E/PC).

MANEJO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos se procesaron mediante la prueba de análisis de varianza ANOVA, adecuada para muestras múltiples que se comparan con un testigo de manera no apareada. Se tomaron como diferencias estadísticamente significativas aquellas con una $P \leq 0.05$. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar.

**DIAGRAMA
EXPERIMENTAL**



RESULTADOS

DOSIS DE 4-AP

Las dosis seleccionadas de 4-AP para cada una de las regiones cerebrales fueron las siguientes, para ventrículo lateral, cuerpo estriado y corteza motora: 75 nmol; y para área tempestas: 50 nmol. Estas dosis permitieron observar cambios conductuales notables que pudieron ser evaluados.

En todas las regiones se probaron concentraciones de 4-AP por debajo de la dosis seleccionada. Cuando se administraron 10 nmol de 4-AP no se observó ningún cambio conductual significativo en ninguna de las regiones, lo mismo sucedió con las dosis de 20 y 30 nmol. En **ventrículo lateral** y **cuerpo estriado** las dosis de 40 y 50 nmol no indujeron modificaciones conductuales significativas, solo se observó inquietud, mioclonos faciales y algunos movimientos masticatorios. Mientras que en **corteza motora** a estas mismas dosis solo se observó postración y mioclonos faciales. En el **área tempestas**, cuando se administró el convulsionante a una dosis de 40 nmol los animales mostraron mioclonos faciales, movimientos masticatorios y sacudidas del cuerpo. Al incrementar la dosis de 4-AP a 50 nmol se presentaron además de las conductas ya observadas las siguientes: salivación, "rearing", sacudidas y levantamiento de cabeza. También en esta región se evaluó el efecto convulsionante de la 4-AP a una dosis de 75 nmol, pero las crisis convulsivas fueron más intensas que las presentadas por administración del convulsionante a esa misma dosis en las demás regiones del cerebro.

EVALUACION DE LOS CAMBIOS CONDUCTUALES INDUCIDOS POR 4-AP

La administración IC de 75 nmol de 4-AP en **ventrículo lateral** produjo hiperexcitabilidad conductual con una latencia de 9 minutos (Fig. 6), durante un período convulsivo de 147 minutos (Fig. 7). El 100% de los animales mostró salivación abundante (Fig. 8), carreras alocadas y convulsiones clónicas con una frecuencia de 2 y 5 E/PC, respectivamente (Tabla 1 y 2). El "rearing" se presentó en más del 90% de los animales con una frecuencia de 9 E/PC (Fig. 9). Sin embargo, sólo en el 85% de los animales se observaron convulsiones

tonico-clónicas generalizadas con una frecuencia de 5 E/PC (Tabla 1). Finalmente, menos del 70% de los animales llegó a presentar el *status epilepticus* (Tabla 1).

La hiperexcitabilidad conductual que indujo la administración IC de 75 nmol de 4-AP en el **cuerpo estriado** tuvo una latencia de aparición y una duración de 10 y 170 minutos, respectivamente (Fig. 6 y 7). El 100% de los animales presentó salivación abundante (Fig. 8), "rearing" y giros contralaterales con una frecuencia de 124 y 70 E/PC, respectivamente (Fig. 9 y Tabla 4). Las carreras alocadas y las convulsiones clónicas sólo se observaron en el 50% de los animales con una frecuencia de 2 y 1 E/PC, respectivamente (Tabla 1 y 2). Sin embargo, sólo el 25% de los animales mostró convulsiones tonico-clónicas generalizadas con una frecuencia de 1 E/PC (Tabla 1). El *status epilepticus* también se observó en el 100% de los animales (Tabla 1).

La administración IC de 75 nmol de 4-AP en **corteza motora** produjo la aparición de hiperexcitabilidad conductual 4 minutos después (Fig. 6), con una duración de 107 minutos (Fig. 7). El 100% de los animales presentó el "rearing" y las sacudidas de perro mojado con una frecuencia de 60 y 52 E/PC, respectivamente (Fig. 9 y Tabla 3). Sin embargo, los giros contralaterales sólo se observaron en el 42% de los animales con una frecuencia de 26 E/PC (Tabla 4). Más del 85% de los animales mostró salivación abundante (Fig. 8) y sólo el 14% tuvo carreras alocadas con una frecuencia de 3 E/PC (Tabla 1). El *status epilepticus* solo se observó en el 28% de los animales (Tabla 1).

La administración IC de 50 nmol de 4-AP en el **área tempestas** indujo la aparición de hiperexcitabilidad conductual con una latencia y una duración de 4 y 88 minutos, respectivamente (Fig. 6 y 7). Todos los animales presentaron salivación abundante (Fig. 8). El "rearing" y las sacudidas de perro mojado se observaron en el 100% de los animales con una frecuencia de 74 y 27 E/PC,

respectivamente (Fig. 9 y Tabla 3). También los levantamientos y las sacudidas de cabeza se observaron en el 100% de los animales con una frecuencia de 46 y 42 E/PC (Datos no mostrados).

EFEECTO PROTECTOR DE LOS ANTAGONISTAS AL RECEPTOR NMDA

La administración del vehículo SSF-colorante en ausencia de la 4-AP no indujo ninguna modificación conductual significativa. En el caso de los antagonistas, su administración en ausencia del convulsionante produjo somnolencia y lentitud en los movimientos de los animales. Efectos que fueron mucho más notorios cuando se administró el MK801(IP). Todos los antagonistas al administrarse conjuntamente con la 4-AP en las diferentes regiones cerebrales evitaron que se presentaran en el 100% de los animales las conductas convulsivas severas, tales como carreras alocadas, convulsiones tónico-clónicas y status epilepticus. A continuación se describirá el efecto protector de los antagonistas del NMDA sobre las conductas producidas por la administración IC de 4-AP, mencionándose aquellos casos donde existe una diferencia significativa.

Ventrículo lateral.

La administración IP de MK801 a una dosis de 0.1 mg/Kg treinta minutos antes de la administración ICV de 75 nmol de 4-AP, no produjo ningún cambio estadísticamente significativo en la frecuencia de las conductas evaluadas. Sin embargo, se observó una disminución en la duración de la hiperexcitabilidad conductual de 30 minutos (Fig. 7) y en el porcentaje de animales que presentaron "rearing", salivación y convulsiones clónicas del 60% (Fig. 9), 43% (Fig.8) y 17% (Tabla 2), respectivamente.

La administración ICV de 10 nmol de MK801 junto con 75 nmol de 4-AP disminuyó la duración de la hiperexcitabilidad conductual en más de 30 minutos (Fig. 7). El porcentaje de individuos que presentaron "rearing" y convulsiones clónicas se redujo en más del 25% (Fig.9) y 43% (Tabla 2), respectivamente. En este caso ninguno de los animales presentó salivación (Fig. 8).

La administración ICV de 10 nmol de CPP y 75 nmol de 4-AP de manera conjunta redujo la duración de la hiperexcitabilidad conductual en más de 30 minutos (Fig. 7). El porcentaje de animales en que se observó el "rearing" y la salivación disminuyó en 60% (Fig. 9) y 43% (Fig. 8), respectivamente.

La administración ICV de 10 nmol de AP7 y 75 nmol de 4-AP hizo que la duración de la hiperexcitabilidad conductual disminuyera en más de 50 minutos (Fig. 7). El porcentaje de animales que presentó salivación se redujo en un 12% (Fig. 8).

En todos los casos la administración de los antagonistas junto con el convulsionante produjo en los animales la aparición de sacudidas de perro mojado (Tabla 3), conducta que no se observó cuando se les administró únicamente la 4-AP.

Cuerpo estriado.

El MK801 administrado por vía IP en una dosis de 0.2 mg/Kg treinta minutos antes de la inyección IE de 75 nmol de 4-AP elevó la frecuencia de "rearing" casi en un 40% (Fig. 9), mientras que la frecuencia de giros contralaterales se incrementó en más del 100% (Tabla 4). El porcentaje de animales en los que se observó salivación disminuyó en un 43% (Fig. 8). Sin embargo, este grupo de animales presentó giros de barril con una frecuencia de 33 E/PC (Datos no mostrados), esta conducta no se observó cuando se administró únicamente la 4-AP.

La administración ICV de 10 nmol de MK801 e IE de 75 nmol de 4-AP disminuyó la duración de la hiperexcitabilidad conductual en casi 35 minutos (Fig. 7). El porcentaje de animales que presentó salivación se redujo en 83% (Fig. 8). Ninguno de los animales tuvo convulsiones clónicas (Tabla 2). Sin embargo, al igual que en el caso anterior, todos los animales mostraron giros contralaterales con una frecuencia de 14 E/PC (Tabla 4).

El CPP administrado por vía ICV en una dosis de 10 nmol poco antes de la administración IE de 75 nmol de 4-AP redujo la duración de la hiperexcitabilidad conductual en más de 30 minutos (Fig. 7). La frecuencia de "rearing" y de giros contralaterales disminuyó en más del 60% en ambos casos (Fig. 9 y Tabla 4). Ninguno de los animales presentó salivación (Fig. 8). Los giros de barril, a diferencia de los dos casos anteriores, sólo se presentaron en el 57% con una frecuencia de 8 E/PC (Datos no mostrados). Sin embargo, más del 85% de los animales presentó convulsiones clónicas con una frecuencia de 1 E/PC (Tabla 2).

La administración ICV de 10 nmol de AP7 seguida de la administración IE de 75 nmol de 4-AP disminuyó la duración de la hiperexcitabilidad conductual en 40 minutos (Fig. 7). La frecuencia de "rearing" se redujo en más del 70% (Fig. 9). La salivación y los giros contralaterales no se presentaron en ninguno de los animales (Fig. 9 y Tabla 4). Sin embargo, el porcentaje de animales en que se observaron convulsiones clónicas incrementó en un 16% (Tabla 2).

Corteza motora.

La administración IP de MK801 en una dosis de 0.2 mg/Kg treinta minutos antes de la administración intracortical de 75 nmol de 4-AP, indujo una reducción de la latencia y la duración de la hiperexcitabilidad conductual en 2 y 23 minutos, respectivamente (Fig. 6 y Fig. 7). El porcentaje de animales en que se observó salivación disminuyó en más del 50% (Fig. 8). Sin embargo, el porcentaje de animales que presentó giros contralaterales se incrementó en más del 50% (Tabla 4).

La administración intracortical de 10 nmol de MK801 y 75 nmol de 4-AP de manera conjunta disminuyó la latencia y duración de la hiperexcitabilidad conductual en más de 2 y en 20 minutos, respectivamente (Fig. 6 y Fig. 7). La frecuencia de "rearing" y de sacudidas de perro mojado se redujo en más del 70% (Fig. 9) y en más del 60% (Tabla 3), respectivamente. El porcentaje de animales que

presentaron giros contralaterales disminuyó en casi el 10% (Tabla 4).

La administración intracortical de 10 nmol de CPP de manera conjunta a la de 75 nmol de 4-AP redujo la duración de la hiperexcitabilidad conductual en más de 20 minutos (Fig. 7). La frecuencia de "rearing" disminuyó en más del 60% (Fig. 9). Los giros contralaterales y la salivación sólo se presentaron en el 33% de los animales (Tabla 4 y Fig. 8).

La administración intracortical de 10 nmol de AP7 y de 75 nmol de 4-AP reduce la frecuencia de "rearing" en más del 60% (Fig. 9), así como el porcentaje de animales que presentaron giros contralaterales y salivación en más del 80%, en ambos casos (Tabla 4 y Fig. 8).

Area tempestas.

La administración IP de MK801 en una dosis de 0.2 mg/Kg treinta minutos antes de la administración IC de 50 nmol de 4-AP en área tempestas hizo que la duración de la hiperexcitabilidad conductual disminuyera en más de 20 minutos (Fig. 7). La frecuencia de "rearing" disminuyó en más del 80% (Fig. 9). El porcentaje de animales que presentó sacudidas de perro mojado se redujo en un 50% y la frecuencia disminuyó en más del 80% (Tabla 3). La salivación no se observó en ninguno de los animales (Fig. 8). El levantamiento y las sacudidas de cabeza disminuyeron en más de 80% y 70%, respectivamente (Datos no mostrados).

La administración IC de 10 nmol de MK801 y de 50 nmol de 4-AP de manera conjunta en el área tempestas produjo una reducción de la duración de la hiperexcitabilidad conductual en más de 40 minutos (Fig. 7). La frecuencia de "rearing" y de sacudidas de perro mojado disminuyeron en más del 70% (Fig. 9) y en poco menos del 50% (Tabla 3), respectivamente. Ninguno de los animales presentó salivación (Fig. 8). La frecuencia de los levantamientos y las sacudidas de

cabeza se redujo en más del 70% y 60%, respectivamente (Datos no mostrados).

La administración IC de 10 nmol de CPP y 50 nmol de 4-AP en área tempestas de manera conjunta produjo una disminución en la duración de la hiperexcitabilidad conductual de más de 30 minutos (Fig. 7). La frecuencia de "rearing" se redujo en más del 70% (Fig. 9). Ninguno de los animales presentó salivación (Fig. 8). La frecuencia del levantamiento y las sacudidas de cabeza disminuyó en más del 70% y 50%, respectivamente (Datos no mostrados).

La administración IC de 10 nmol de AP7 y de 50 nmol de 4-AP de manera conjunta en área tempestas redujo la duración de la hiperexcitabilidad conductual en más de 20 minutos (Fig. 7). La frecuencia de "rearing" disminuyó en más del 70% (Fig. 9). Ningún animal presentó salivación (Fig. 8). La frecuencia del levantamiento y las sacudidas de cabeza se redujo en más del 60% y 50%, respectivamente (Datos no mostrados).

DISCUSSION

La administración IC de 4-AP en ventrículo lateral, cuerpo estriado, corteza motora y área tempestas produce crisis límbicas con un período convulsivo largo y una latencia relativamente corta. Las dosis utilizadas de 4-AP no producen la muerte de ninguno de los animales durante el período convulsivo, sin embargo, inducen hiperreactividad inicial, mioclonos de la cara, temblores, olfateo, conductas exploratorias, acicalamiento, movimientos masticatorios, salivación, sacudidas de perro mojado, sacudidas de la cabeza, "rearing", convulsiones clónicas, convulsiones tonico-clónicas, carreras alocadas y *status epilepticus*, conductas que también se producen tras la administración sistémica o intrahipocampal de 4-AP (90, 91). El "rearing" se presentó independientemente de la región en la que se administró la 4-AP, lo cual implica que posiblemente la estimulación de las regiones estudiadas incide sobre un circuito neuronal común responsable de la expresión de este patrón convulsivo.

Las diferencias observadas en la latencia de hiperexcitabilidad conductual en ventrículo lateral y cuerpo estriado con respecto a la observada en corteza motora y área tempestas, no se debe a una diferencia en la susceptibilidad de las regiones para la generación de actividad convulsiva, sino a que se emplearon métodos de administración estereotáxica diferentes. En el caso del ventrículo lateral y el cuerpo estriado las drogas fueron administradas mediante inyección estereotáxica y el aumento en el período de latencia puede estar relacionado con el efecto depresivo del anestésico halotano sobre la generación de potenciales postsinápticos excitatorios (101).

El efecto protector que ejercen los antagonistas del NMDA en las crisis convulsivas inducidas por la administración IC de 4-AP no es total, sin embargo, si es significativo, ya que impiden que se presenten las conductas convulsivas más severas, lo que confirma la posible asociación de la activación del receptor NMDA con la presentación de convulsiones tonico-clónicas, carreras alocadas y

status epilepticus, propuesta por Fragoso-Veloz y Tapia (98).

Los antagonistas del NMDA producen una reducción del período convulsivo, pero no alteran la latencia de aparición de la actividad alterada inducida por administración IC de 4-AP, lo que sugiere que la activación de los receptores NMDA es importante para la propagación de las crisis convulsivas más que para su iniciación o extinción. En apoyo a lo anterior existen antecedentes de que la generación de las descargas epileptiformes inducidas en neocorteza por bloqueo de la transmisión GABAérgica depende de la activación de los receptores no-NMDA, mientras que la activación de los receptores NMDA es importante en la prolongación de la duración de las descargas (66).

El efecto protector ejercido por los antagonistas del NMDA fue diferente para cada una de las regiones seleccionadas, el mayor efecto protector se observó en el área tempestas, seguido por el que se obtuvo en corteza motora, ventrículo lateral y cuerpo estriado. Este efecto protector máximo en el área tempestas pudiera estar relacionado con el hecho de que la dosis de 4-AP utilizada para esta región fue menor que para las otras regiones, sin embargo, las evidencias experimentales han demostrado que el área tempestas es una región altamente epileptogénica, que genera crisis convulsivas por aplicación focal de antagonistas del GABA, de agonistas muscarínicos y de agonistas a AAE, requiriendo en todos los casos de la activación de los receptores NMDA, ya que sus antagonistas pueden bloquear las manifestaciones conductuales inducidas por la administración de estas drogas (102). La variación en cuanto al efecto protector ejercido por los antagonistas del NMDA en cada región, así como la persistencia de algunas conductas, puede deberse a que en cada una de las regiones seleccionadas convergen diferentes terminales nerviosas de varios sistemas de neurotransmisión, y debido a que la 4-AP produce una liberación masiva e inespecífica de neurotransmisores (70), también se liberan otras sustancias transmisoras diferentes del Glu, sobre los cuales

los antagonistas del NMDA no pueden ejercer un control satisfactorio. Este fenómeno se observó en el cuerpo estriado donde la administración IE de los antagonistas del NMDA no ejerció ningún efecto protector, sin embargo, al administrar los antagonistas por vía ICV si se observó un efecto protector, lo que sugiere que posiblemente en esta región el Glu no está relacionado con la expresión de las crisis convulsivas y que el bloqueo de los receptores NMDA en otras regiones puede regular la excitabilidad del estriado. La diferencias observadas en la protección ejercida por los antagonistas del NMDA en cada una de las regiones puede también estar relacionada con las diferencias en la densidad de receptores NMDA de cada región (17).

Al parecer la transmisión glutamatérgica está implicada en la generación de crisis límbicas, a través de la regulación que ejerce sobre otros sistemas de neurotransmisión, primordialmente GABAérgico, dopaminérgico, colinérgico y serotoninérgico, todos estos sensibles al efecto excitatorio inducido por la 4-AP. Esto ha llevado a sugerir que la generación de crisis límbicas es modulada por sistemas excitatorios que controlan las salidas de los ganglios basales, donde la importancia relativa de los receptores NMDA y no-NMDA varía, dependiendo de los diferentes componentes ganglionares implicados (103). Tanto los receptores NMDA como no-NMDA están implicados en la generación de descargas epileptiformes producidas por 4-AP (104, 105, 106), sin embargo, ninguno de los antagonistas de estos receptores ha logrado eliminar por completo estas descargas. La supresión total de descargas epileptiformes y de las conductas convulsivas inducidas por 4-AP se ha logrado mediante la utilización de anticonvulsionantes de amplio espectro como el diltiazem (107), fenitoina, carbamazepina y valproato, los cuales disminuyen de manera general la hiperexcitabilidad (108).

Los resultados obtenidos a través de la realización de este trabajo sugieren que la transmisión glutamatérgica vía activación del receptor NMDA está implicada en el establecimiento de las

crisis convulsivas inducidas por 4-AP y que los antagonistas del NMDA pueden ser considerados realmente como anticonvulsionante promisorios, sin embargo, son necesarios más estudios para poder establecer su uso efectivo, pues aunque pueden evitar que se presenten ciertas crisis convulsivas, también pueden intervenir con la actividad normal del receptor NMDA.

CONCLUSIONES

La administración intracerebral de 4-AP en ventrículo lateral, cuerpo estriado, corteza motora y área tempestas induce crisis convulsivas, caracterizadas por un período inicial de hiperreactividad seguido de una hiperexcitabilidad máxima.

La activación de los receptores NMDA está implicada en el establecimiento de las crisis convulsivas inducidas por la administración intracerebral de 4-AP, probablemente a nivel de la propagación más que a nivel de la iniciación o extinción de las crisis.

El efecto protector de los antagonistas al NMDA no es total pero si es significativo, ya que impide que se presenten las conductas convulsivas más severas inducidas por la administración intracerebral de 4-AP, tales como las convulsiones tonico-clónicas, las carreras alocadas y el *status epilepticus*, lo que implica una participación importante del Glu en el proceso convulsivo, sin descartar la participación de otros sistemas de neurotransmisión igualmente importantes.

TABLAS Y FIGURAS

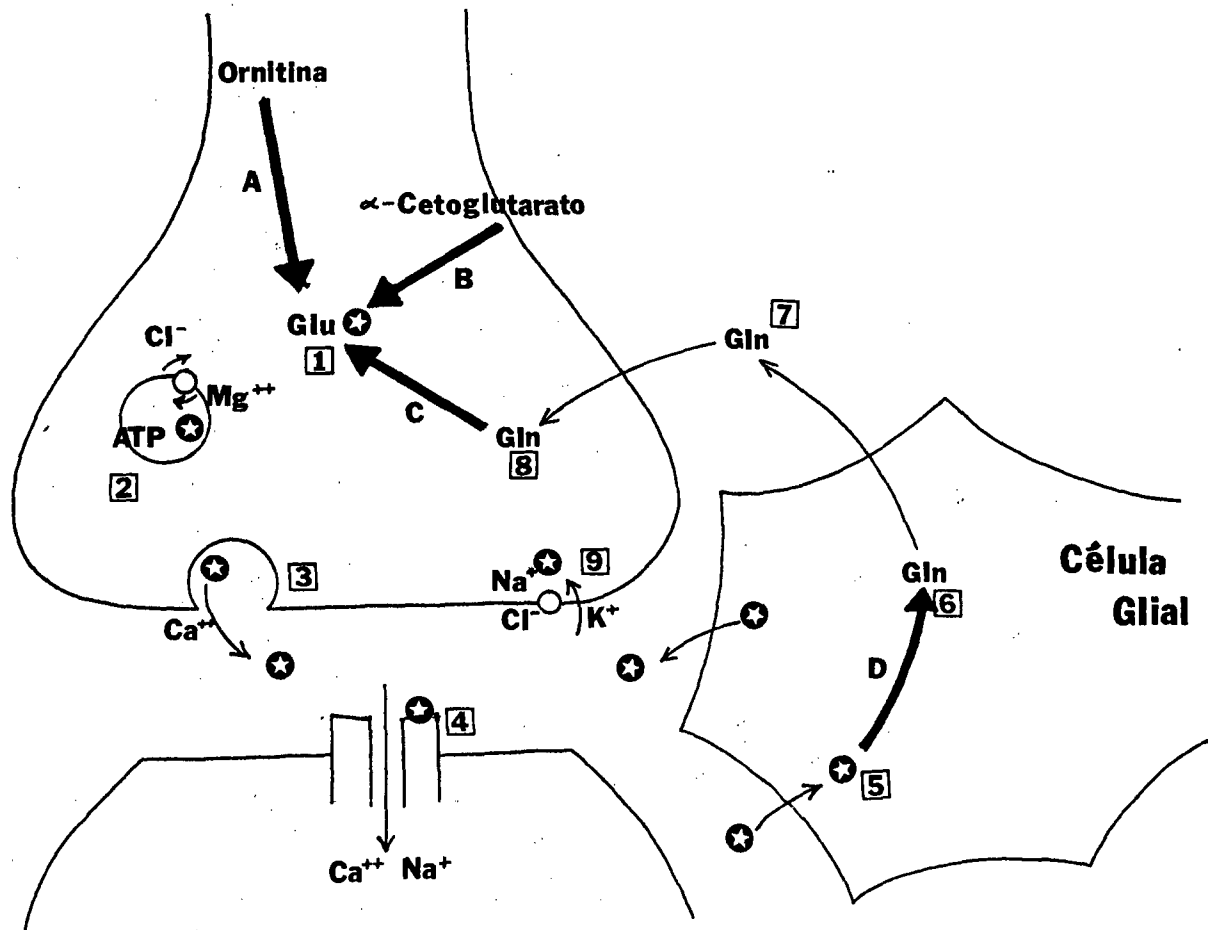
FIGURA 1

Diagrama esquemático de la neurotransmisión glutamatérgica que muestra todos los procesos implicados en la participación del Glu como neurotransmisor.

1. Síntesis de Glutamato
2. Captura de alta afinidad en vesículas intracelulares
3. Liberación a partir de vesículas
4. Interacción con receptores presinápticos
5. Captura de baja afinidad en células gliales
6. Conversion a Glutamina (Gln)
7. Liberación de Gln
8. Captura de Gln por la terminal presináptica
9. Captura de Glu por la terminal presináptica

ENZIMAS: (A) Ornitin amino transferasa
(B) Deshidrogenasa del ácido glutámico
(C) Glutamina sintetasa
(D) Glutaminasa

Terminal Presináptica



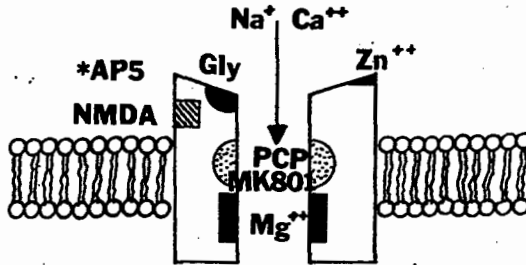
Célula Postsináptica

FIGURA 2

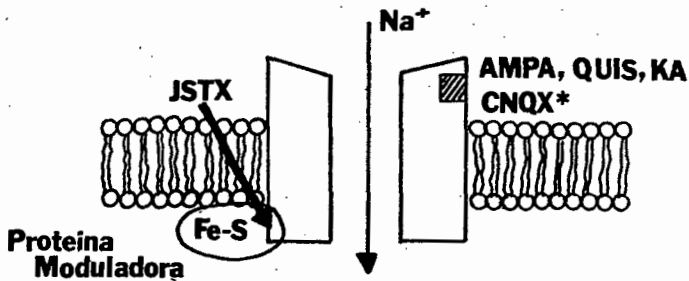
Diagrama esquemático que muestra los diferentes tipos de receptores postsinápticos a Glu, los efectos de su activación y los sitios de regulación farmacológica que poseen.

- (AP-5) 2-amino-5-fosfonovalerato
- (NMDA) N-metil-D-aspartato
- (Gly) Glicina
- (PCP) Fenciclidina
- (QUIS) Quiscualato
- (KA) Kainato
- (JSTX) Neurotoxina de *Nephila clavata*
- (CNQX) 6-ciano-nitro-quinoxalina-2,3-diona
- (AMPA) amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol propionato
- (ACPD) 1-amino-ciclopentil-1,3-dicarboxilato
- (IBO) Ibotenato
- (G) Proteína tipo G
- (PP) Fosfolípido
- (PIP₂) Fosfatidil inositol-4,5-bifosfato
- (PCC) Proteína cinasa C
- (DAG) Diacil glicerol
- (IP₃) Inositol-1,4,5-trifosfato
- (Fe-S) Centro de hierro y azufre
- (*) Antagonistas competitivos

1. RECEPTOR TIPO NMDA



2. RECEPTOR TIPO NO-NMDA



3. RECEPTOR METABOTROPICO

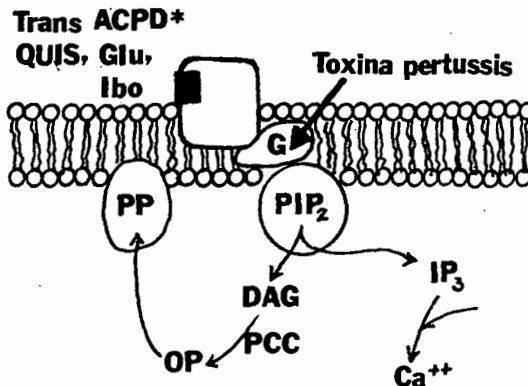


FIGURA 3

Diagrama esquemático del receptor a glutamato tipo NMDA que muestra el tipo de permeabilidad iónica generada por su activación, así como los diferentes sitios de modulación farmacológica que posee.

- (Ca⁺⁺) Ión calcio
- (Na⁺) Ión sodio
- (K⁺) Ión potasio
- (Zn⁺⁺) Ión Zinc
- (Mg⁺⁺) Ión Magnesio
- (PCP) Fencicidina
- (MK-801) Dizocilpina

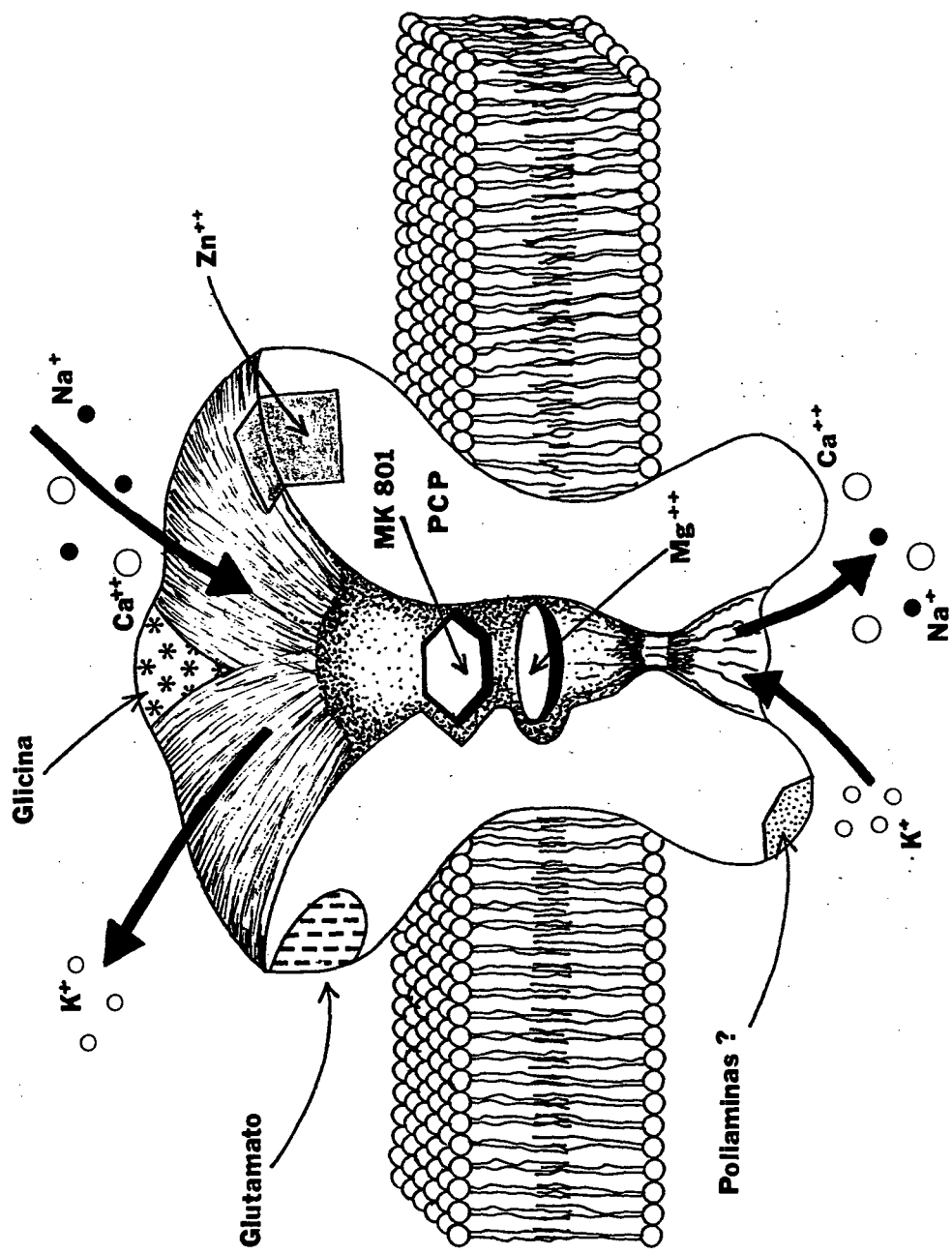


FIGURA 4

Diagrama esquemático que muestra las principales vías de neurotransmisión glutamatérgica del cerebro de mamíferos.

(C) Corteza	(H) Hipocampo
(Am) Amígdala	(LGN) Núcleo geniculado lateral
(Cb) Cerebelo	(NR) Núcleo rojo
(CE) Cuerpo estriado	(OI) Oliva inferior
(CN) Núcleo cuneato	(SN) Sustancia nigra
(T) Tálamo	(CS) Colículo superior

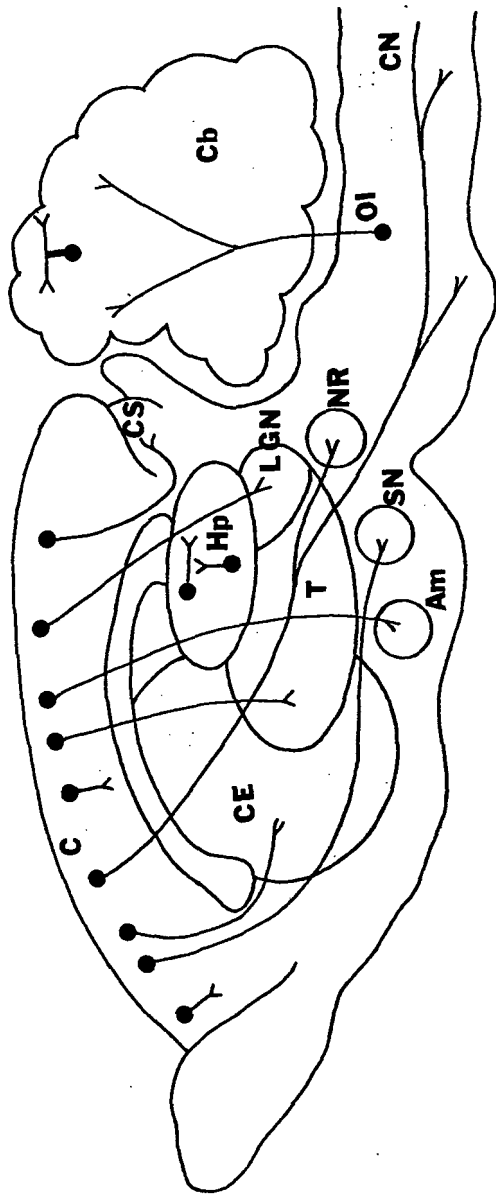


FIGURA 5

Diagrama esquemático que muestra los mecanismos celulares implicados en la hiperexcitabilidad y muerte neuronal, las manifestaciones clínicas producidas por estas alteraciones y los tipos de intervención farmacológica que pueden tener lugar.

**MECANISMOS
CELULARES**

**MANIFESTACIONES
CLINICAS**

DECREMENTO DE ACTIVIDAD
INHIBITORIA (GABA)

ALTERACION FUNCIONAL
DE ASTROCITOS

INCREMENTO DE ACTIVIDAD
EXCITATORIA (GLUTAMATO)

HIPEREXCITABILIDAD
NEURONAL

MUERTE
NEURONAL

AGENTES
ANTIPILEPTICOS

AGENTES
NEUROPROTECTIVOS

CRISIS
CONVULSIVAS

DEFICIENCIAS
NEUROFISIOLOGICAS

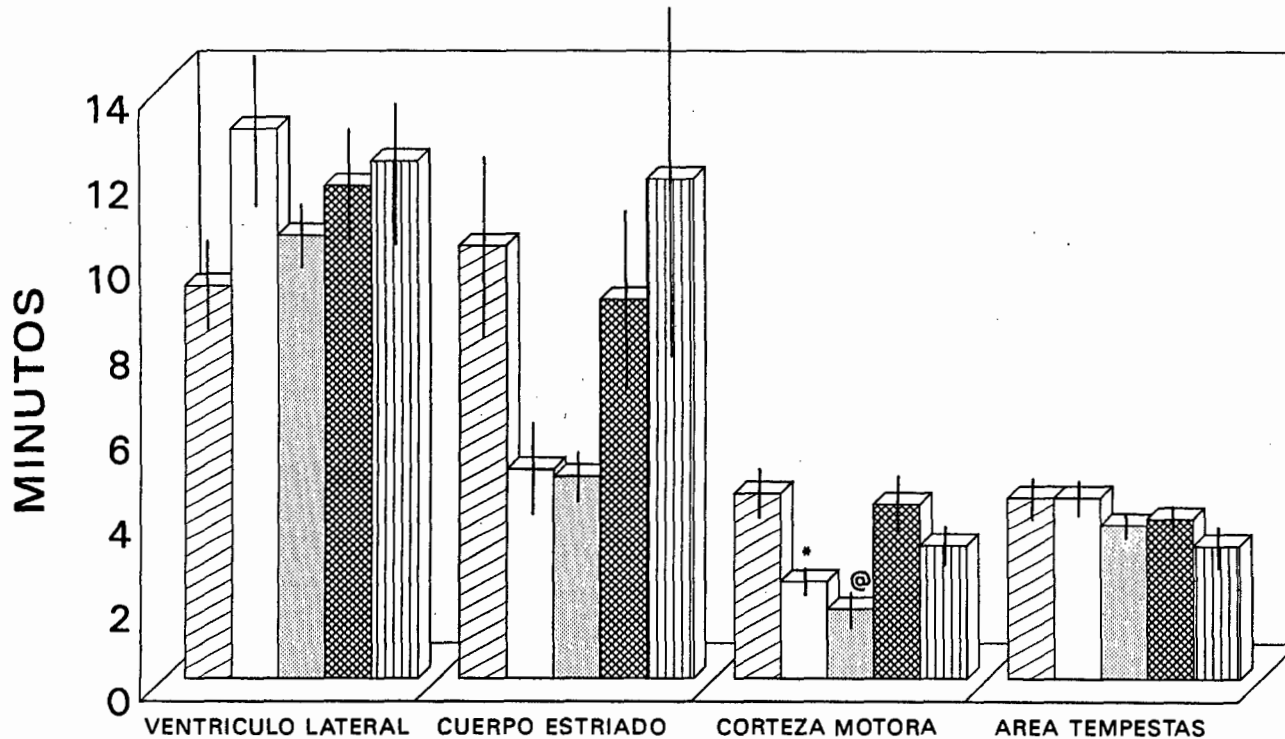
INTERVENCION
FARMACOLOGICA

FIGURA 6

LATENCIA (HIPEREXCITABILIDAD CONDUCTUAL)

Esta gráfica muestra el efecto de los antagonistas al NMDA sobre la latencia de aparición de la conducta alterada inducida por la administración IC de 4-AP en ventrículo lateral, cuerpo estriado, corteza motora y área tempestas, en minutos. Los resultados expresan la $X \pm E.E.M.$ de cada uno de los grupos.

LATENCIA (HIPEREXCITABILIDAD)



TRATAMIENTOS

▨ 4-AP □ 4-AP + MK801 (IP) ▩ 4-AP + MK801 (IC) ▤ 4-AP + CPP ▧ 4-AP + AP7

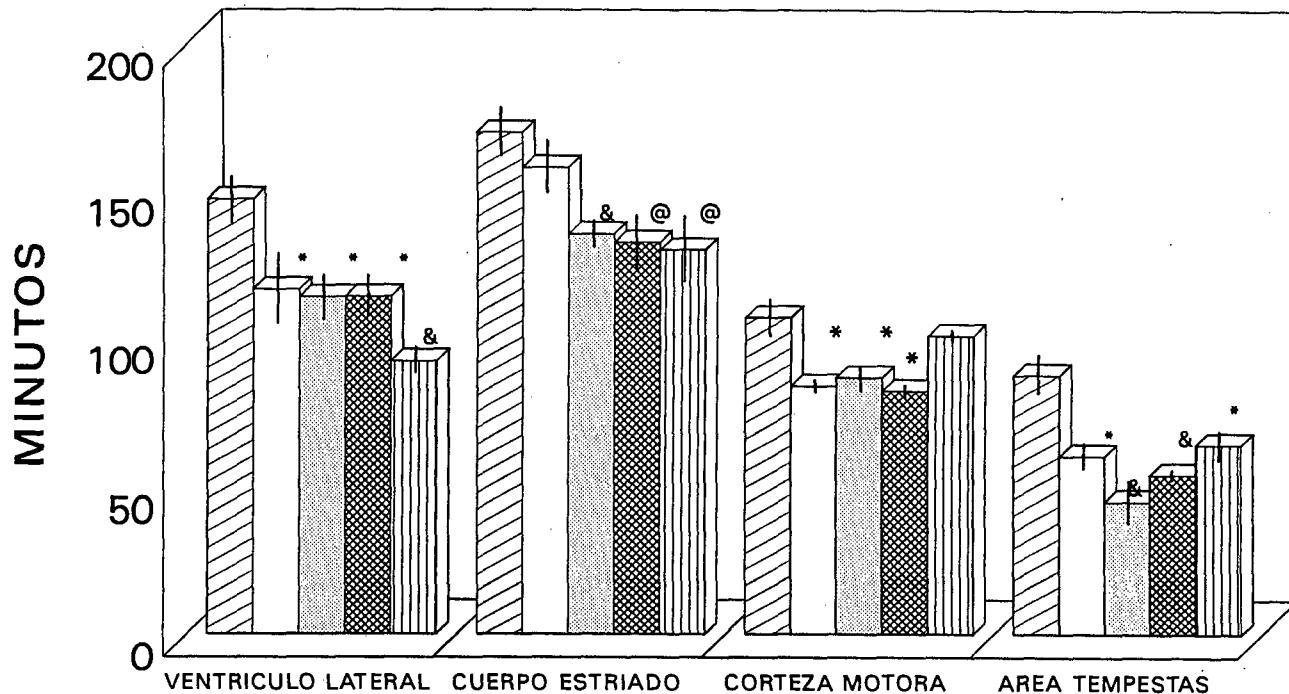
*P 0.05 @P 0.005 &P 0.001

FIGURA 7

DURACION (HIPEREXCITABILIDAD CONDUCTUAL)

Esta gráfica muestra el efecto de los antagonistas al NMDA sobre la duración de la conducta alterada (período convulsivo) inducida por la administración IC de 4-AP en ventrículo lateral, cuerpo estriado, corteza motora y área tempestas, en minutos. Los resultados se expresan como la $X \pm E.E.M.$ de cada uno de los grupos.

DURACION (HIPEREXCITABILIDAD)



TRATAMIENTOS

▨ 4-AP □ 4-AP + MK801 (IP) ▩ 4-AP + MK801 (IC) ▩ 4-AP + CPP ▨ 4-AP + AP7

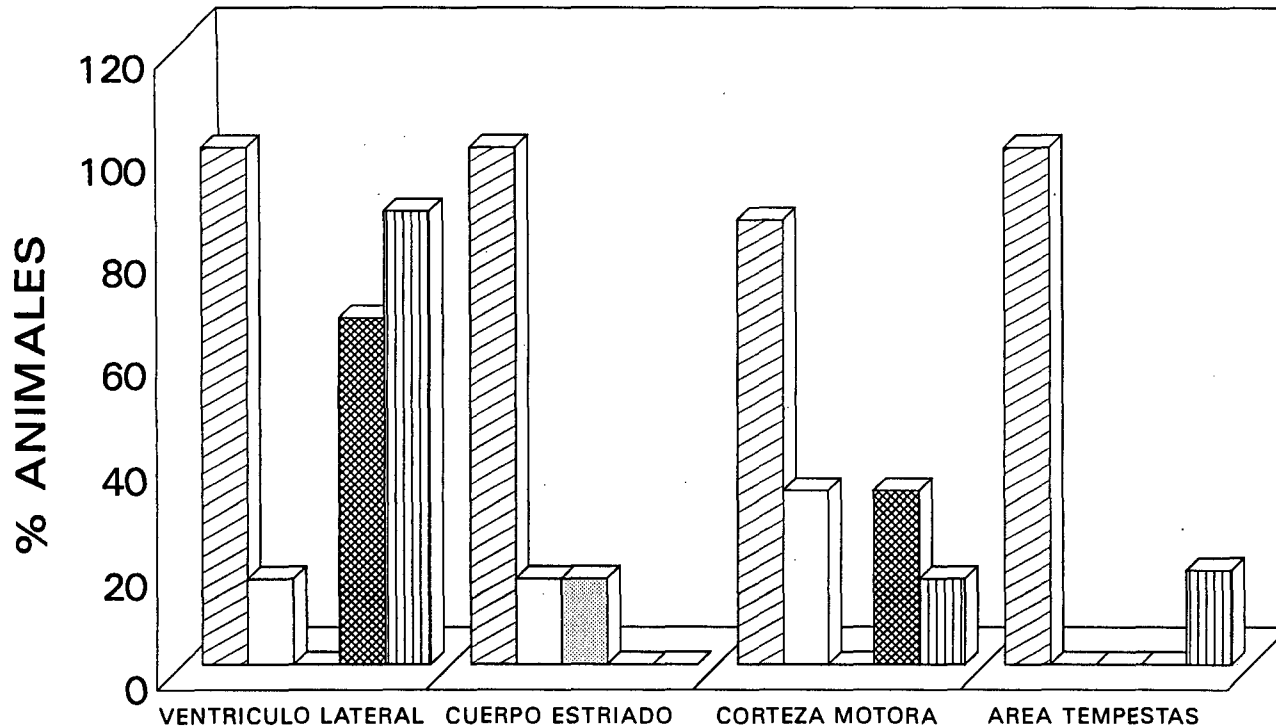
*P 0.05 @P 0.005 &P 0.001

FIGURA 8

SALIVACION

Esta gráfica muestra el efecto de los antagonistas al NMDA sobre el porcentaje de animales que presentan salivación por efecto de la administración IC de 4-AP en ventrículo lateral, cuerpo estriado, corteza motora y área tempestas.

SALIVACION



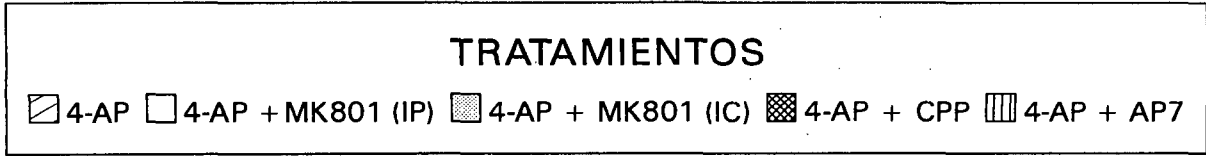
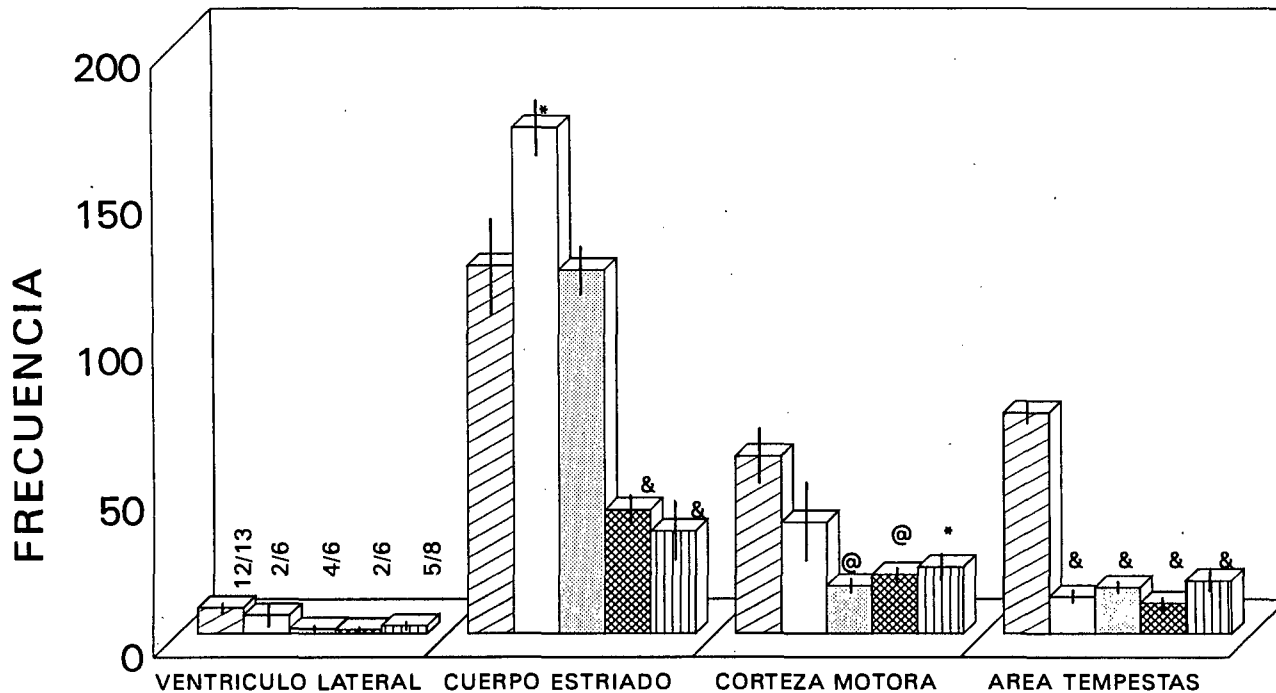
TRATAMIENTOS

▨ 4-AP □ 4-AP + MK801 (IP) ▩ 4-AP + MK801 (IC) ▤ 4-AP + CPP ▧ 4-AP + AP7

FIGURA 9
FRECUENCIA DE "REARING"

Esta gráfica muestra el efecto de los antagonistas al NMDA sobre la frecuencia de "rearing" durante el período convulsivo inducido por la administración IC de 4-AP en ventrículo lateral, cuerpo estriado, corteza motora y área tempestas. Los resultados se expresan como $X \pm E.E.M.$ de cada grupo.

"REARING"



*P 0.05 @P 0.005 &P 0.001

TABLA 1
CONDUCTAS CONVULSIVAS SEVERAS INDUCIDAS POR LA
ADMINISTRACION INTRACEREBRAL DE 4-AP

En esta tabla se muestran la frecuencia (E/PC) y el porcentaje de animales que presentaron convulsiones tonico-clónicas, carreras alocadas y *status epilepticus*, conductas convulsivas severas inducidas por la administración IC de 4-AP en ventrículo lateral, cuerpo estriado y corteza motora. La frecuencia de aparición de estas conductas se expresa como la $X \pm E.E.M.$

CONDUCTAS CONVULSIVAS SEVERAS

(TRATAMIENTO CON 4-AP)

CONDUCTA	REGIONES		
	VENTRICULO LATERAL	CUERPO ESTRIADO	CORTEZA MOTORA
CONVULSIONES TONICO-CLONICAS	85.71% 5.28 ± 1.83	25% 1.50 ± 0.50	-----
CARRERAS ALOCADAS	100% 2.71 ± 0.26	50% 3.0 ± 1.73	14.28% 3.0 ± 0.0
ESTATUS EPILEPTICUS	69.23% 2.77 ± 0.26	100% 2.25 ± 0.63	28.57% 3.0 ± 0.0

*P 0.05 @P 0.005 &P 0.001

TABLA 2
CONVULSIONES CLONICAS

Esta tabla muestra el efecto de los antagonistas al NMDA sobre la de convulsiones clónicas inducidas por la administración de 4-AP en ventrículo lateral y cuerpo estriado. La frecuencia conductual (E/PC) se expresa como la $X \pm E.E.M.$

CONVULSIONES CLONICAS

TRATAMIENTO	REGIONES	
	VENTRICULO LATERAL	CUERPO ESTRIADO
4-AP	5.50 ± 1.19	50% 1.25 ± 0.50
4-AP + MK801 (IP)	83.33% 3.6 ± 1.67	0%
4-AP + MK801 (IC)	66.66% 3.5 ± 0.64	0%
4-AP + CPP	5.0 ± 1.02	85.71% 1.33 ± 0.21
4-AP + AP7	5.5 ± 1.68	66.66% 1.25 ± 0.25

*P 0.05 @P 0.005 &P 0.001

TABLA 3

SACUDIDAS DE PERRO MOJADO

Esta tabla muestra el efecto de los antagonistas al NMDA sobre las sacudidas de perro mojado inducidas por la administración IC de 4-AP en ventrículo lateral, corteza motora y área tempestas. La frecuencia conductual (E/PC) se expresa como la $X \pm E.E.M.$

SACUDIDAS DE PERRO MOJADO

TRATAMIENTO	REGIONES		
	VENTRICULO LATERAL	CORTEZA MOTORA	AREA TEMPESTAS
4-AP	-----	53.43 ± 12.35	27.33 ± 4.75
4-AP + MK801 (IP)	129.33 ± 27.48	44.83 ± 17.80	50% 5.0 ± 1.53*
4-AP + MK801 (IC)	72.83 ± 5.11	17.17 ± 2.30*	14.17 ± 2.91*
4-AP + CPP	39.33 ± 9.24	36.50 ± 4.92	18.0 ± 3.28
4-AP + AP7	122.12 ± 37.43	83.0 ± 11.50	20.1 ± 2.03

*P 0.05 @P 0.005 &P 0.001

TABLA 4
GIROS CONTRALATERALES

Esta tabla muestra el efecto de los antagonistas al NMDA sobre los giros contralaterales inducidos por la administración IC de 4-AP en cuerpo estriado y corteza motora. La frecuencia conductual (E/PC) se expresa como la $X \pm E.E.M.$

GIROS CONTRALATERALES

TRATAMIENTO	REGIONES	
	CUERPO ESTRIADO	CORTEZA MOTORA
4-AP	70.37 ± 16.85	42.83% 26.0 ± 9.85
4-AP + MK801(IP)	177.67 ± 36.36*	35.67 ± 19.47
4-AP + MK801(IC)	48.83 ± 5.39	33.33% 4.0 ± 2.0
4-AP + CPP	27.89 ± 6.80	33.33% 3.0 ± 0.0
4-AP + AP7	66.67 ± 35.19	16.66% 17.0 ± 0.0

*P 0.05 @P 0.005 &P 0.001

BIBLIOGRAFIA

1. **LOPEZ-ANTUNEZ, L.** (1983) "Anatomía funcional del sistema nervioso", LIMUSA, México, p.p. 5-8.
2. **NOBACK, C.R.** y R.J. Demarest (1980) "Sistema Nervioso Humano. Fundamentos de Neurobiología", McGraw-Hill, México, p.p. 33-34.
3. **SIEGEL, G., B. Agranoff, B.W. Albers y P. Malinoff** (1989) "Basic Neurochemistry", 4ta. ed., Raven Press, New York, p.p. 7-8.
4. **GILMAN, S.** y S.S. Winans (1984) "Lo esencial en Neuroanatomía y Neurofisiología de Manter y Gatz", Manual Moderno, México, p.p. 4-5.
5. **PORTER, R.J.** y M. A. Rogawski (1992) "New antiepileptic drug: from serendipity to rational discovery", *Epilepsia* 33(suppl.1):S1-S6.
6. **RUBIO-DONNADIE, F.** (1989) "Generalidades y clasificación de la epilepsia", En: *Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario* (Feria-Velasco, A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio-Donnadieu, F., eds.), 2da. ed., Trillas, México, p.p. 19-27.
7. **VELASCO, M., F. Velasco y R. Romo** (1985) "Anatomía Funcional", En: *Epilepsia. Principios y práctica* (Velasco, M., edt.), IMSS, México, p.p. 61-74.
8. **SOLIS-ORTIZ, H.** y J. Arauz-Contreras (1989) "Modelos experimentales de epilepsia", En: *Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario* (Feria-Velasco, A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio-Donnadieu, F., eds.), 2da ed., Trillas, México, p.p. 74-97.
9. **OTERO, E.** (1985) "Neuroquímica", En: *Epilepsia. Principios y práctica* (Velasco, M., edt.), IMSS, México, p.p. 89-98.
10. **FONNUM, F.** e I. Walaas (1978) "The effect of intrahippocampal kainic acid injection y surgical lessions of neurotransmitters in hippocampus and septum", *J. Neurochem.*, 31:1173-1181.
11. **CURTIS, D.R., J.W. Phillis y J.C. Watkins** (1959) "Chemical excitation of spinal neurons", *Nature* (London), 183:611-613.
12. **COTMAN, C.W., A. Foster y T. Lanthorn** (1981) "An overview of glutamate as a neurotransmitter", En: *Glutamate as a neurotransmitter* (Di Chiara, G. y Gessa, G.L., eds.), Raven Press, New York, p.p. 1-27.
13. **WAELESH, H.** (1951) "Glutamic acid and cerebral function", *Advan. Protein Chem.*, 6:299-341.
14. **ROBINSON, M.B.** y J.T. Coyle (1987) "Glutamate and related

acidic excitatory neurotransmitters: from basic science to clinical application", *FASEB J.*, 1:446-455.

15. CURTIS, D.R. y G.A.R. Johnston (1974) "Amino acid transmitters in mammalian central nervous system", *Rev. Physiol.*, 69:97-188.

16. WATKINS, J.C. y R.H. Evans (1981) "Excitatory amino acid transmitters", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21:165-204.

17. MCGEER, P.L. y E.G. McGeer (1989) "Amino acid neurotransmitters", En: *Neurochemistry Basic* (Siegel, G., Agranoff, B., Albers, R.W. y Molinoff, P., eds.), 4ta. ed., Raven Press, New York, p.p. 311-332.

18. MAGNUSSON, K.R., A.A. Larson, J.E. Madl, R.A. Altschuler y A.J. Beitz (1986) "Co-localization of fixative-modified glutamate and glutaminase in neurons of the spinal trigeminal nucleus of the rat: an immunohistochemical and immunoradiochemical analysis", *J. Comp. Neurol.*, 247:477-490.

19. KAUPPINEN, R.A., H.T. McMahon y D.G. Nicholls (1988) " Ca^{+2} -dependent and Ca^{+2} -independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca^{+2} concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: possible relevance to hypoglycaemia and anoxia", *Neuroscience*, 27(1):175-182.

20. NICHOLLS, D.G., T.S. Sihra y J. Sánchez-Prieto (1987) "Calcium dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry", *J. Neurochem.*, 49:50-57.

21. KANNER, B. y E. Marva (1982) "Efflux of L-glutamate by synaptic plasma membrane vesicles from rat brain", *Biochemistry*, 21:3143-3147.

22. LOGAN, W.J. y S.H. Snyder (1972) "High-affinity uptake systems for glycine, glutamate and aspartate in rat CNS synaptosomes", *Brain Res.*, 42:413-431.

23. STALLCUP, W.B., K. Bulloch y E.E. Baetge (1979) "Coupled transport of glutamate and sodium in cerebellar nerve cell line", *J. Neurochem.*, 32:57-65.

24. TAKAGAKI, G. y H. Konagaya (1985) "Properties of the uptake and release of neurotransmitter glutamate in cerebral cortical tissue of guinea pigs", *Neurochemical Res.*, 10(8):1059-1069.

25. FOSTER, A.C. y G.E. Fagg (1984) "Acidic amino acid binding

sites in mammalian neuronal membranes: Their characteristics and relationship to synaptic receptors", *Brain Res. Rev.*, 7:103-164.

26. WATKINS, J.C. y H. Olverman (1987) "Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors", *Trends Neurosci.*, 10:265-272.

27. BUHRLE, C.P. y U. Sonnhof (1983) "The ionic mechanism of the excitatory action of glutamate upon the membrane of motoneurons of the frog", *Pflugers Arch.*, 396:154-162.

28. ASCHER, P. y L. Nowak (1987) "Electrophysiological studies of NMDA receptors", *Trends Neurosci.*, 10:284-288.

29. SLADCEZEK, F., J.P. Pin, M. Recansens, J. Bockaert y S. Weiss (1985) "Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones", *Nature (London)*, 317:717-719.

30. RAYMOND, L.A., C.D. Blackstone y R.L. Huganir (1993) "Phosphorylation of amino acid neurotransmitter receptors in synaptic plasticity", *Trend Neurosci.*, 16(4):147-152.

31. McDERMOTT, A.B., M.L. Mayer, G.L. Westbrook, S.J. Smith y J. Barker (1986) "NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones", *Nature*, 321:519-522.

32. MAYER, M.L. y G.L. Westbrook (1987) "The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system", *Prog. Neurobiol.*, 28:197-276.

33. COTMAN, C.W. y D.T. Monaghan (1988) "Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic Plasticity", *Ann. Rev. Neurosci.*, 11:61-80.

34. WONG, E.H.F. y J.A. Kemp (1991) "Sites for antagonism on the N-Methyl-D-Aspartate receptor channel complex", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 31:401-425.

35. GANONG, A.H. y C.W. Cotman (1985) "Kynurenic acid and quinolinic acid act at N-methyl-D-aspartate receptors in the rat hippocampus", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236:293-299.

36. DO, K.Q., P.L. Herrling, P. Streit, W.A. Turski y M. Cuenod (1986) "In vitro release and electrophysiological effects in situ of homocysteic acid, an endogenous N-methyl-D-aspartic acid agonist, in the mammalian striatum", *J. Neurosci.*, 6:2226-2234.

37. DAVIES, J., A.A. Francis, A.W. Jones y J.C. Watkins (1981) "2-amino-5-phosphonovalerate (2-APV): a potent and selective antagonist of amino acid and synaptic activation", *Neurosci.*

Lett., 21:77-82.

38. PERKINS, M.N., T.W. Stone, J.F. Collins y K. Curry (1981) "Phosphonate analogues of carboxylic acids as amino acid antagonists on rat cortical neurones", *Neurosci. Lett.*, 23:333-336.
39. DAVIES, J., R.H. Evans, P.L. Herrling, A.W. Jones y H.J. Olverman (1986) "CPP, a new potent and selective NMDA antagonist. Depression of central neuron responses, affinity for ³H-D-AP5 binding sites on brain membranes and anticonvulsant activity", *Brain Res.*, 383:169-173.
40. LEHMANN, J., A.G. Chapman, B.S. Meldrum, A. Hutchinson, C. Tsai y P.L. Wood (1988) "CGS 19755 is a potent and competitive antagonist at NMDA-type receptors", *Eur. J. Pharmacol.*, 154:89-93.
41. AULT, B., R.H. Evans, A.A. Francis, D.J. Oakes y J.C. Watkins (1980) "Selective depression of excitatory amino acid induced depolarizations by magnesium ions in isolated spinal cord preparation", *J. Physiol.*, 307:413-428.
42. NOWAK, L., P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbert y Z. Prochiantz (1984) "Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons", *Nature*, 307:462-465.
43. ASCHER, P. y L. Nowak (1988) "The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture", *J. Physiol.*, 399:247-266.
44. HONEY, C.R., Z. Miljkovic y J.F. McDonald (1985) "Ketamine and phencyclidine cause a voltage-dependent block of responses to L-aspartic acid", *Neurosci. Lett.*, 61:135-139.
45. WONG, E.H.F., J.A. Kemp, T. Priestly, A.R. Knight, G.N. Woodruff y L.L. Iversen (1986) "The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist", *Proc. Natl. Sci. USA*, 83:7104-7108.
46. ARAM, J.A., J. Church, S.N. Davis, D. Lodge y D. Martin (1986) "Comparasion of phenicyclidina, thienylcyclohexylpiperidina y MK-801 as NMDA antagonists on rat spinal and cortical neurones", *Br. J. Pharmacol.*, 89:778-779.
47. JOHNSON, J.W. y P. Ascher (1987) "Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons", *Nature*, 325:329-331.
48. MARCIANI, M.G., P. Stanzione, E. Cherubini y G. Barnardi (1980) "Action mechanisms of γ -aminobutyric acid (GABA) and

glycine on rat cortical neurons", *Neurosci. Lett.* 18:169-172.

49. KEMP, J.A., A.C. Foster, P.D. Leeson, T. Priestly, R. Tridgett, L.L. Iversen y G.N. Woodruff (1988) "7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:6547-6550.

50. WETSBROOK, G.L. y M.L. Mayer (1987) "Micromolar concentrations Zn^{2+} antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons", *Nature*, 328:640-643.

51. CHRISTINE, C.W. y D.W. Choi (1990) "Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons", *J. Neurosci.*, 10:108-116.

52. ASSAF, S.Y. y S.H. Chung (1984) "Release of endogenous Zn^{2+} from brain tissue during activity", *Nature*, 308:734-736.

53. YEH, G.C., D.W. Bonhaus y J.O. McNamara (1990) "Evidence that zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor-gated ion channel activation by non-competitive antagonism of glycine binding", *Mol. Pharmacol.*, 38:14-19.

54. WONG, E.H.F., A.R. Knight y G.N. Woodruff (1988) "[³H]-MK801 labels a site on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex in rat brain", *J. Neurochem.*, 50:274-81

55. KESSLER, M., T. Terramani, G. Lynch y M. Baudry (1989) "A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists", *J. Neurochem.*, 52:1319-1328

56. RANSOM, R.W. y N.L. Stec (1988) "Cooperative modulation of [³H]-MK801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines", *J. Neurochem.*, 51:830-836.

57. WILLIAMS, K., C. Romano y P.B. Molinoff (1989) "Effects of polyamines on the binding of [³H]-MK801 to the NMDA receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site", *Mol. Pharmacol.*, 36:575-581.

58. FONNUM, F. (1984) "Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain", *J. Neurochem.*, 42:1-11.

59. McDONALD, J.W. y M.V. Johnston (1990) "Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development", *Brain Res. Rev.*, 15:41-70.

60. BEN-ARI, Y., E. Tremblay, M. Berger y L. Nitecka (1984)

"Kainic acid seizure syndrome and binding sites in developing rats", *Dev. Brain Res.*, 14:284-288.

61. BECQUET D., M. Faudon y F. Henry (1990) "In vivo evidence for an inhibitory glutamatergic control of serotonin release in the cat caudate nucleus: involvement of GABA neurons", *Brain Res.*, 519:82-88.

62. HEINEMANN, U., J. Arens, J.P. Dreier, J. Stabel y C.L. Zhang (1991) "In vitro epileptiforme activity: role of excitatory amino acids", *Epilepsy Res.*, 10:18-23.

63. OLNEY, J.W. (1974) "Toxic effects of glutamate and related amino acids on the developing central nervous system", En: *Heritable disorders of amino acid metabolism* (Nyhan, W.N., eds.), John Wiley, New York, p.p. 124-165.

64. SLOVITER, R.S. (1983) "Epileptic brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies", *Brain Res. Bull.*, 10:675-697.

65. MELDRUM, B.S. (1985) "Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters", *Clin. Sci.*, 68:113-122.

66. HWA, G.G.C. y M. Avoli (1991) "The involvement of excitatory amino acids in neocortical epileptogenesis: NMDA and non-NMDA receptors", *Exp. Brain Res.*, 86:248-256.

67. GILBERT, M.E. y C.M. Mack (1990) "The NMDA antagonist, MK-801, suppresses long-term potentiation, kindling, and kindling-induced potentiation in the perforant path of unanesthetized rat", *Brain Res.*, 519:89-96.

68. GILBERT, M.E. (1988) "The NMDA-receptor antagonist, MK-801, suppresses limbic kindling and kindled seizures", *Brain Res.* 463:90-99.

69. GLOVER, W.E. (1982) "The aminopyridines", *Gen. Pharmacol.*, 13:259-285.

70. PASANTES-MORALES, H. y M.E. Arzate (1981) "Effect of taurine on seizures induced by 4-aminopyridine", *J. Neurosci. Res.*, 6:465-474.

71. THESLEFF, S. (1980) "Aminopyridines and synaptic transmission", *Neurosci.*, 5:1413-1419.

72. KIM, Y.I., M.M. Goldner y D.B. Sanders (1980) "Facilitatory effects of 4-aminopyridine on normal neuromuscular transmission", *Muscle and Nerve*, 3:105-111.

73. **BUYUKUYSAL, R.L.** y R.J. Wurtman (1990) "4-Aminopyridine increases acetylcholine release without diminishing membrane fosfatidilcholine", *J. Neurochem.*, 54:1302-1309.

74. **LUNDH, H.**, S. Leander y S. Thesleff (1977) "Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat", *J. Neurol. Sci.*, 32:29-43.

75. **UCHIYAMA, T.**, J. Molgó y M. Lemeignan (1981) "Presynaptic effects of bekamycin at the frog neuromuscular junction. Reversibility by calcium and aminopyridines", *Eur. J. Pharmacol.*, 72:271-280.

76. **DAVIDSON, M.**, Z. Zemishlay, R.C. Mohs, T.B. Horvath, P. Powchik, J.P. Blass y K.L. Davis (1988) "4-Aminopyridine in the treatment of Alzheimer's Disease", *Biol. Psychiatry*, 23:485-490.

77. **BUYUKUYSAL, R.L.** y R.J. Wurtman (1989) "Tetrahydroaminoacridine but not 4-aminopyridine inhibits high affinity choline uptake in striatal and hippocampal synaptosomes", *Brain Res.*, 482:371-375.

78. **TAPIA, R.** y M. Sitges (1982) "Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes", *Brain Res.*, 250:291-299.

79. **ARZATE, M.E.**, J. Morán y H. Pasantes-Morales (1986) "Inhibitory effect of taurine on 4-aminopyridine-stimulated release of labelled dopamine from striatal synaptosomes", *Neuropharmacol.*, 25(7):689-694.

80. **DOLEZAL, V.** y S. Tucek (1983) "The effects of 4-aminopyridine and tetrodotoxin on release of acetylcholine from rat striatal slices", *Arch. Pharmacol.*, 323:90-95.

81. **ARZATE, M.E.**, H. Ponce y H. Pasantes-Morales (1984) "Antagonistic effects of taurine and 4-aminopyridine on guinea pig ileum", *J. Neurosci. Res.*, 11:271-280.

82. **VAN BOGAERT, P.P.** y D.J. Snyders (1982) "Effects of 4-aminopyridine on inward rectifying and pacemaker currents of cardiac Purkinje fibres", *Eur. J. Physiol.*, 394:230-238.

83. **THOMSEN, R.H.** y D.F. Wilson (1983) "Effects of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine on transmitter release at neuromuscular junction", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 227:260-265.

84. **PERREULT, P.** y M. Avoli (1989) "Effects of low concentrations of 4-aminopyridine on CA1 pyramidal cells of hippocampus", *J. Neurophysiol.*, 61(5):953-970.

85. **JANKOWSKA, E.**, A. Lundberg, P. Rudomin y E. Synkova (1977) "Effects of 4-aminopyridine on transmission in excitatory and

inhibitory synapses in the spinal cord", *Brain Res.*, 136:387-392.

86. **VOSKULY, R.A.** y H. Albus (1985) "Spontaneous epileptiform discharges in hippocampal slices induced by 4-aminopyridine", *Brain Res.*, 342:54-66.

87. **HEEMSKERK, F.M.J.**, L.H. Schrama, P.N.E. de Graan y W.H. Gispen (1987) "4-Aminopyridine inhibits synaptosomal plasma membrane protein phosphorylation *in vitro*: effect of the selective NMDA-antagonist 2-amino-5-phosphonovalerate", *Biochem. and Biophysic. Res. Comm.*, 147(1):94-99.

88. **TAPIA, R.** (1982) "Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in mice by 4-aminopyridine, guanidine and lanthanum", *Neurosci. Lett.*, 30:73-77.

89. **DAMSA, G.**, P.T.M. Biessels, B.H.C. Westerink, J.B. De Vries y A.S. Horn (1988) "Differential effects of 4-aminopyridine and 2,4-diaminopyridine on the *in vivo* release of acetylcholine and dopamine in freely moving rat measured by intrastriatal dialysis", *Eur. J. Pharmacol.*, 145:15-20.

90. **FRAGOSO-VELOZ, J.**, L. Massieu, R. Alvarado y R. Tapia (1990) "Seizures and wet dog shakes induced by 4-AP and their potentiation by nifedipine", *Eur. J. Pharmacol.*, 178:275-281.

91. **ALEMAN, V.** y D. Martínez de Muñoz (1985) "Estudio sobre la generación de convulsiones por drogas", *Ciencia*, 36:147-145.

92. **AGOSTON, D.**, P. Hargittai y A. Nagy (1983) "Effects of a 4-aminopyridine in calcium movements and changes of membrane potential in pinched-off nerve terminals from rat cerebral cortex", *J. Neurochem.*, 41:745-751.

93. **PASKOV, D.S.**, S. Agoston y W.C. Bowman (1986) "4-Aminopyridine hydrochloride (pymadin)", En: *New neuromuscular blocking agents* (Kharkovich, D.A., ed.), Springer Verlag, Berlin, 676 pgs.

94. **ROGAWSKI, M.A.** y J.L. Barker (1983) "Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons", *Brain Res.*, 280:180-185.

95. **BURLEY, E.S.** y R.S. Jacobs (1981) "Effects of 4-aminopyridine on nerve terminal action potentials", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 219:268-273.

96. **ALKADHI, K.A.** e I.H. Hogan (1989) "Effect of calcium on synaptic facilitation by potassium channel blockers in superior cervical ganglion of rat", *Neuropharmacol.*, 28(1)75-81.

97. **GANDOLFO, G.**, C. Gottesmann, J. N. Bidard y M. Lazdunski

(1985) "Ca²⁺ channel blockers prevent seizures induced by a class of K⁺ channel inhibitors", *Eur. J. Pharmacol.*, 160:173-177.

98. FRAGOZO-VELOZ, J. y R. Tapia (1992) "NMDA receptor antagonist protect against seizures and wet dog shakes induced by 4-aminopyridine", *Eur. J. Pharmacol.*, 221:275-280.

99. HEEMSKERK, F.M.J., L.H. Schrama y W.H. Gispen (1989) "Activation of protein kinase C by 4-aminopyridine dependent on Na⁺ channel activity in hippocampal slices", *Neurosci. Lett.*, 106:315-321.

100. PAXINOS, G. y C. Watson (1986) "The rat brain in stereotaxic coordinates", 2da. ed., *Academic Press*, New York.

101. SUGIYAMA, K., T. Muteki y K. Shimoji (1992) "Halothane-induced hyperpolarization and depression of postsynaptic potentials of guinea pig thalamic neurons in vitro", *Brain Res.*, 576:97-103.

102. WARDAS, J., J. Graham y K. Gale (1990) "Evidence for a role glycine in area tempestas for triggering convulsive seizures", *Eur. J. Pharmacol.*, 187:59-66.

103. PATEL, S., G.B. de Sarro y B.S. Meldrum (1988) "Regulation of seizure threshold by excitatory amino acids in the striatum and entopeduncular nucleus of rats", *Neurosci.*, 27(3):837-850.

104. GEAN, P.W. (1990) "The epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat amygdala slice: antagonism by non-N-methyl-D-aspartate receptor antagonist", *Brain Res.*, 530:251-256.

105. PERREAULT, P. y M. Avoli (1991) "Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices", *J. Neurophysiol.*, 65(4):771-785.

106. PSARROPOULOU, C. y M. Avoli (1992) "CPP, an NMDA-receptor antagonist, blocks 4-aminopyridine-induced spreading depression episodes but not epileptiform activity in immature rat hippocampal slices", *Neurosci. Lett.*, 135:139-143.

107. GEAN, P.W. y S.M. Chou (1991) "Suppression of 4-aminopyridine-induced paroximal depolarizing shift in rat amygdaloid neurons by diltiazem", *Brain Res.*, 560:306-310.

108. YAMAGUCHI, S. y M.A. Rogawski (1992) "Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice", *Epilepsy Res.*, 11:9-16.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente

Número

Sección

C. MONICA ELISA URENA GUERRERO
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis "EVALUACION CONDUCTUAL DEL EFECTO PROTECTOR DE LOS ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR TIPO NMDA (N-METIL-D-ASPARTATO) SOBRE LAS CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACION DE 4-AMINO PIRIDINA (4-AP)" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informo que ha sido aceptada como Director de dicha Tesis el M.en C. Alberto Morales Villagran.

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
Guadalajara, Jal., 26 de Julio de 1993.
EL DIRECTOR



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

DR. EULOGIO PIMIENTO BARRIOS

EL SECRETARIO

M. EN C. MA. GEORGINA GUZMAN GODINEZ

c.c.p.- M. en C. Alberto Morales Villagran: Director de tesis.-
pte. c.c.p.- El expediente del alumno.

DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

P R E S E N T E .

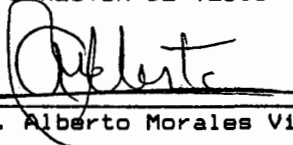
A través de este conducto nos permitimos comunicarles que la C. MONICA ELISA URENA GUERRERO, pasante de la Licenciatura en Biología con número de código 086384124 ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado "EVALUACION CONDUCTUAL DEL EFECTO PROTECTOR DE LOS ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NMDA (N-metil-D-aspartato) SOBRE LAS CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR 4-AP (4-amino piridina)". Asimismo, le informamos que habiendo revisado el manuscrito de tesis, consideramos que cumple con los requisitos establecidos para su impresión y para la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 04 de Abril de 1994

DIRECTOR DE TESIS



M. en C. Alberto Morales Villagrán

SINODALES

1. Dr. Fernando Alfaro Bustamante
2. M. en C. Carlos Beas Zárate
3. G.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega

