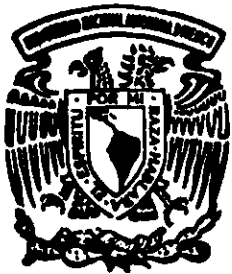


11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**División de Estudios de Posgrado**

**Instituto Mexicano del Seguro Social**

**Jefatura de Servicios de Investigación Médica**

**Unidad de Investigación Médica en Neurofisiología**

10

**"Efecto conductual y electroencefalográfico de la aplicación de microinyecciones de penicilina sódica cristalina en la formación reticular mesencefálica del gato y su mecanismo de acción"**

**T E S I S**

**Que para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biomédicas (Fisiología)**

**P r e s e n t a**

**FIACRO JIMENEZ PONCE**



**Tutor: Dr. Francisco Velasco Campos**

**México, D. F.**

**2000**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**El presente trabajo de investigación se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Neurofisiología de la Coordinación de Investigación Médica del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS en la Ciudad de México.**

### **COMITE TUTORIAL**

**Tutor:**

**Dr. Francisco Velasco Campos  
Unidad de Investigación Médica en Neurofisiología  
Coordinación de Investigación Médica  
Centro Médico Nacional Siglo XXI**

**Cotutores:**

**Dr. Alfredo Feria Velasco  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y  
Diseño del Estado de Jalisco**

**Dr. Héctor Ponce Monter  
Unidad de Investigación Médica en Farmacología Coordinación  
de Investigación Médica Centro Médico Nacional Siglo XXI**

**Miembros del Jurado**

**Presidente: Dr. Augusto Fernández Guardiola**

**Secretario: Dr. Ricardo Tapia Iburgüengoytia**

**Primer Vocal: Dr. Francisco Velasco Campos**

**Segundo Vocal: Dr. Miguel Condes Lara**

**Tercer Vocal: Dr. Miguel Luján Estrada**

**Suplente: Dr. Carlos Paz Tres**

**Suplente: Dra. Lourdes Massieu Trigo**

## RESUMEN

El origen de las crisis convulsivas generalizadas es aun controvertido, aunque se sospecha de la participación del tallo cerebral en el desarrollo de este tipo de actividad paroxística. El sitio exacto del área involucrada no ha sido precisado y ha sido señalado dentro de diversas zonas de la formación reticular o en estructuras específicas mesencéfalicas.

Por otro lado, la diversidad de modelos experimentales de epilepsia ha complicado el estudio de las crisis tónico clónicas generalizadas que pueden ser reproducidas utilizando estimulación química de la corteza cerebral, de la formación reticular mesencefálica, pontina o bulbar, de la sustancia negra o de otras estructuras. La diversidad de dosis y vías de administración de los agentes convulsivantes y los diferentes efectos paroxísticos producidos, así como sus mecanismos de acción dificultan el problema. En el presente estudio utilizamos a la penicilina como un agente convulsivante cuyo mecanismo de acción antigabaérgico es bien conocido. Esta fue administrada tópicamente en forma programada en áreas discretas del tallo cerebral de gatos adultos. En la fase inicial del estudio se utilizó una solución de penicilina 850 mM para determinar el sitio generador de crisis convulsivas. En la segunda parte del estudio se obtuvo una caracterización conductual y electroencefalográfica del modelo de crisis administrando penicilina isoosmolar 212mM en la formación reticular mesencefálica a dosis crecientes. Se obtuvo una curva dosis respuesta de la penicilina y se determinó el efecto sobre la actividad multiunitaria local y cortical. En la tercera fase del estudio se reprodujeron los efectos obtenidos por la aplicación de penicilina utilizando un agente antagonista gabaérgico específico como lo es la bicuculina, y se desarrolló la correspondiente curva dosis - respuesta. En la cuarta fase del estudio se utilizó muscimol como agente agonista gabaérgico para inhibir el efecto convulsivante de la penicilina o de la bicuculina.

El presente trabajo propone un modelo de epilepsia para crisis tónico clónicas generalizadas; caracteriza el desarrollo de las crisis en forma conductual y por un patrón de registro electroencefalográfico y propone un sistema gabaérgico dosis dependiente en una zona específica del tegmento mesencefálico.

### **Summary**

The origin of generalized convulsive seizures still remains unclear, though it is suspected the involvement of the brain stem in the development of this paroxysmic activity. The precise site of the area involved has not yet been defined although it has been located within diverse areas of the reticular formation or within specific mesencephalic structures.

On the other hand, the multiplicity of experimental models of epilepsy has complicated the study of the generalized tonic clonic seizures (GTCS). GTCS has been replicated using chemical stimulation at the cerebral cortex, at the mesencephalic reticular formation (MRF), pontine or bulbar reticular formation, at the substantia nigra or the other structures. Various doses and administering paths of the convulsive agents and the various paroxysmic effects generated as well as the mechanisms of action complicate the problem furthermore.

In the present study, penicillin was used as a convulsive agent whose antigabaergic mechanism of action is well known. This agent was topically administered in a planned way in punctual areas of the brain stem of adult cats. In the initial phase of the study a solution 850 mM of penicillin was used to determine the generator site of GTCS. In the second part of the study a behavioral and electroencephalographic characterization of the seizure models was obtained using 212mM isoosmolar penicillin dilution at the MRF in growing doses. A dose response curve and its effects over the local and cortical multi unit activity were determined. In the third phase of study the obtained effects were replicated using a specific antagonist gabaergic agent such as bicucullin and its corresponding dose response curve was obtained.

In the fourth stage of the study, muscimol was used as an agonist gabaergic agent to inhibit the convulsivant effect of either penicillin or bicucullin.

The present study proposes an epilepsy model of GTCS. This study gives a description of the seizure development behaviorally as well as by means of its EEG pattern and it goes further proposing a dose dependant gabaergic system in a specific area of the mesencephalic tegmentum.

**Quiero agradecer a:**

**Mi esposa por su amor**

**Mis hijos por existir**

**Mis padres**

**Por su amor**

**Mi Maestro y amigo**

**Dr. Francisco Velasco Campos**

**Mi compañero y amigo**

**Dr. José D. Carrillo Ruiz**

**Mi amigo**

**Tec. Inv. Sr. Francisco Estrada Villanueva**

**Al Instituto Mexicano del Seguro Social**

**Por apoyar mi formación y la realización de esta tesis**

<b>INDICE</b>	
<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>6</b>
<b>I INTRODUCCION</b>	
1.- El origen de las crisis tónico clónicas generalizadas	7
2.- Modelo de epilepsia con penicilina	15
<b>II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	
1.- Limitaciones de los modelos de crisis convulsivas	21
2.- Relevancia del problema	23
<b>III HIPOTESIS</b>	<b>24</b>
<b>IV OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>V MATERIAL Y METODOS</b>	
1.- Descripción de la preparación	25
2.- Determinación del área crítica epileptógena	30
3.- Determinación de curva dosis – respuesta de penicilina	30
4.- Relación EEG, EMG y AMU	32
5.- Curva dosis respuesta de bicuculina posterior a penicilina	33
6.- Efecto de bicuculina sin tratamiento previo con penicilina	34
7.- Determinación de efecto sumado de penicilina y bicuculina	34
8.- Efecto de penicilina o bicuculina mas muscimol	34
9.-Efecto de sodio hiperosmolar	35
10.- Control histológico	36
11.- Aspectos éticos y de bioseguridad	37
<b>VI RESULTADOS</b>	
1.- Localización del área epileptógena	38
2.- Curva dosis - respuesta de penicilina	44
3.- Análisis de AMU por aplicación de penicilina	50
4.-Correlación temporal de EEG y AMU cortical, reticular y muscular	53
5.- Efecto de bicuculina previa dosis de penicilina	55
6.- Efecto de bicuculina sin dosis previa de penicilina	57
7.- Efecto sumado de penicilina y bicuculina	59
8.- Efecto de penicilina o bicuculina más muscimol	60
9.- Efecto de solución hipertónica de sodio	60
10.- Análisis estadístico de los sitios inyectados	60
<b>VI DISCUSION</b>	<b>62</b>
<b>VII BIBLIOGRAFIA</b>	<b>76</b>
<b>VIII ARTICULO</b>	<b>86</b>



## **INTRODUCCION**

### **1.- Origen de las crisis tónico clónicas generalizadas.**

**No obstante las diferentes etiologías que pueden tener las crisis tónico clónicas generalizadas, sus patrones de expresión motora son estereotipados. Aunado a ello, el inicio generalizado y súbito de las crisis y la actividad eléctrica generalizada del registro electroencefalográfico orientan a pensar en la existencia de ciertas vías anatómicas que las originan y que las propagan independientemente de su etiología. Penfield en 1954 propuso la existencia de un sistema anatómico y fisiológico subcortical con extensas áreas de conexión dentro del sistema nervioso central que al ser afectado por actividad eléctrica paroxística, puede propagar esta actividad prácticamente a todo el sistema nervioso de forma instantánea.**

**Dempsey y Morison en 1942 demostraron que la estimulación eléctrica diferencial a alta o a baja frecuencia en los núcleos intralaminares del tálamo de gatos producía respectivamente un efecto de despertar o de arresto conductual, estos datos apoyan la idea de un sistema talámico de proyección difusa hacia la corteza.**

**Posteriormente Moruzzi y Magoun (1949) demostraron que la estimulación eléctrica de la formación reticular en el mesencéfalo producía un patrón de despertar en el electroencefalograma de gatos anestesiados.**

**Los estudios anatómicos de Scheibel y Scheibel (1958) mostraron la amplia distribución de los axones de las neuronas de la formación reticular, tanto hacia el tálamo como hacia la médula espinal y apoyan la**

idea de la existencia de un sistema subcortical que pudiera originar o propagar una actividad convulsiva generalizada.

Se ha demostrado ya que la estimulación eléctrica de este sistema reticular o talámico puede producir crisis convulsivas generalizadas, acompañadas de alteraciones electroencefalográficas como espiga - onda a 3 ciclos por segundo (Pollen 1963 y Weir 1964).

Kreindler (1958) encontró que la estimulación eléctrica de 0.2 a 2 mA a una frecuencia de 50 Hz de la formación reticular del tallo cerebral del gato o la rata puede producir crisis tónicas autosostenidas, aun en ausencia de un patrón electroencefalográfico hipersincrónico y a pesar de efectuar una sección mesencefálica alta que divide las vías anatómicas entre tallo cerebral y corteza. Bergmann (1963) confirmó estos hallazgos en conejos al estimular específicamente la formación reticular mesencefálica de 0.1 a 0.5 mA de 16 a 240 Hz y Burnham (1987), observó que las crisis producidas por la estimulación eléctrica de la formación reticular dependían de la intensidad de la estimulación aplicada. Burnham pudo reproducir crisis a lo largo de toda la formación reticular del tallo cerebral; sin embargo, observó que la formación reticular mesencefálica era la zona más sensible para producir crisis con una intensidad mínima de 0.1 a 2 mA a 60 Hz.

Por otro lado, el patrón de crisis tónico clónicas generalizadas producidas por la aplicación de pentilinetetrazol sistémico puede ser modificado después de la sección a diferentes niveles del tallo cerebral (Velasco 1975, Faingold y Caspary 1987). Así, en una preparación *encéphale isolé*, la aplicación sistémica de pentilinetetrazol produce incremento significativo de actividad multiunitaria (AMU) en la formación reticular del mesencéfalo y del puente 5 a 10 segundos antes que se

**observe actividad epiléptica (espigas) en el electroencefalograma (EEG) o actividad rápida y de mayor amplitud (que se refleja en sacudidas motoras) en el electromiograma (EMG) (Figura 1 A).**

**Velasco (1981) demostró que con la administración intravenosa de pentilenetetrazol en una sección pretrigeminal (que divide la formación reticular del mesencéfalo respecto a la formación reticular del puente), la AMU de la formación reticular mesencefálica antecede 5 a 10 segundos a la AMU de la formación reticular del puente y a la actividad electroencefalográfica rápida de la corteza, además no se presenta en el EMG registro de convulsión (Figura 1B).**

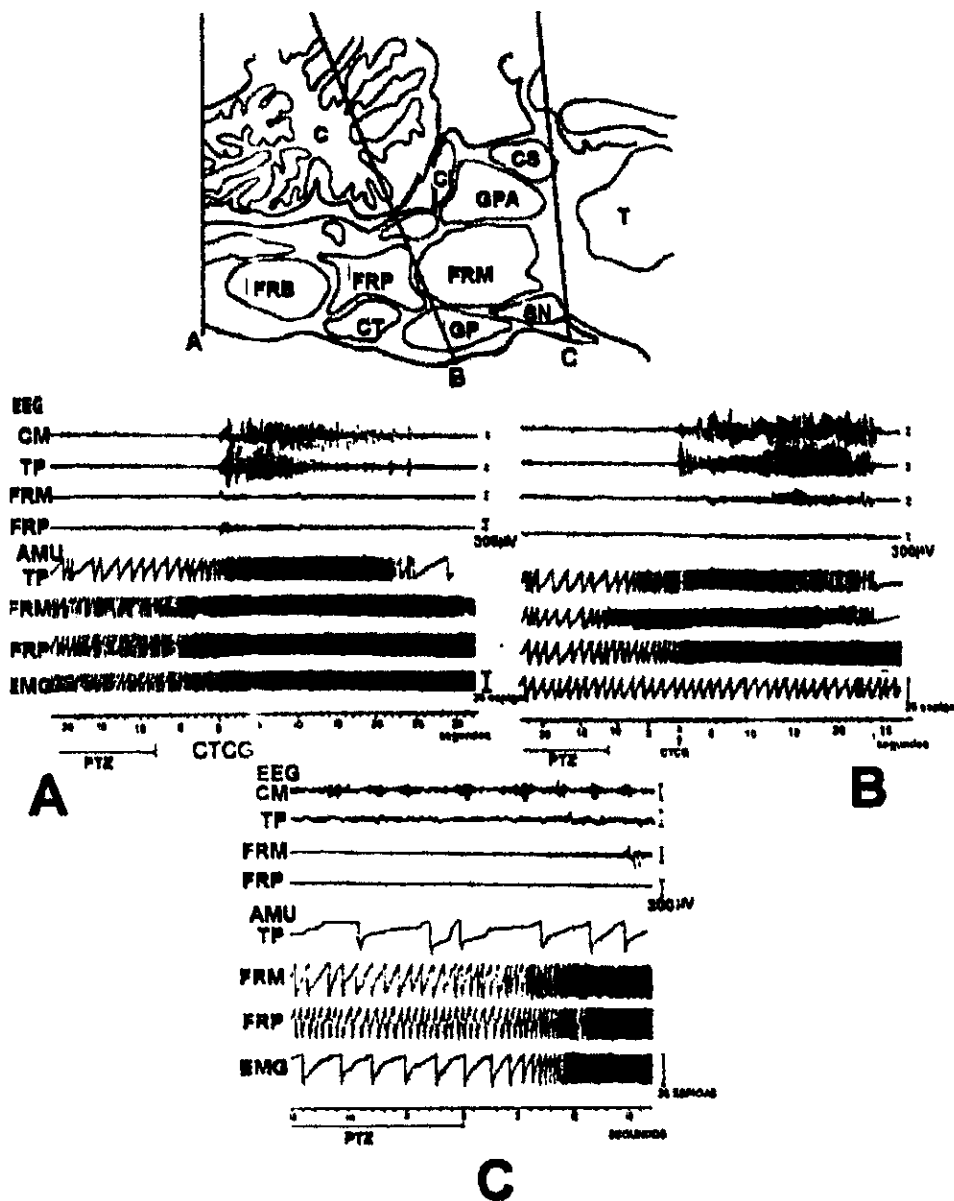


Figura 1. Efectos sobre el electroencefalograma (EEG) y la actividad multiunitaria (AMU) por la sección a diferentes niveles del tallo cerebral debidos a la aplicación sistémica de pentilinetetrazol. La AMU está integrada por un "stair cage generator", de forma que cada escalera representaría la suma de 25 unidades AMU seleccionadas sobre el ruido de fondo a través de un discriminador de ventana. (A) En encéfalo aislé la AMU de la formación reticular mesencefálica (FRM) y la de la formación reticular pontina (FRP) se anticipan 5 segundos cualquier otra actividad muscular (registrada en los músculos del cuello) o cortical. (B) En una sección pretrigeminal, el PTZ produce un incremento de la AMU de la FRM 10 segundos antes del inicio de las crisis EEG, en este caso, no se observa un patrón de actividad motora. (C) Finalmente en una preparación cervau aislé, la AMU de la FRM se anticipa 5 segundos al inicio de crisis motoras aun sin observarse patrón EEG con una crisis muscular tónica que duró 100 veces mas que en el animal intacto. C (cerebelo), CI (colículo inferior), CM (corteza inferior), CS (colículo superior), CT (cuerpo trapezoidal), FRB (formación reticular bulbar), FRM (formación reticular mesencefálica), FRP (formación reticular pontina), GP (gris pontino), GPA (gris periacueductal), T (tálamo), TP (tracto piramidal), SN (sustancia negra), (Velasco 1989).

Finalmente, una sección de tipo *cervau isolé* por delante del colículo superior muestra un aumento simultáneo de AMU de la FRM y pontina en ausencia de un incremento de la actividad eléctrica cortical pero en presencia de actividad convulsiva en el EMG con una crisis que duró 100 veces más que la crisis registrada en las preparaciones previas (Velasco 1989) (Figura 1C).

Tuttle y Elliot (1969) aplicaron directamente microinyecciones de pentilinetetrazol en la formación reticular mesencefálica (FRM) y produjeron crisis generalizadas. Una aplicación similar de pentilinetetrazol a través de cánulas Push-Pull a la FRM y pontina pudo determinar, aun con mayor precisión, el efecto diferencial de este agente convulsivante dado que produjo crisis mioclónicas al ser aplicada rostralmente en la FRM y crisis tónico clónicas generalizadas al aplicarse caudalmente, mientras que produjo hipotonía muscular generalizada al aplicarse en la formación reticular pontina (FRP) (Velasco 1985). (Figura 2). Sin embargo, el mecanismo de acción del pentilinetetrazol no es tan claro como el de otros agentes convulsivantes como la penicilina.

En 1965 Ralston y Langer aplicaron penicilina sódica cristalina en solución de 1700 mM en gatos anestesiados y traqueostomizados en un volumen de 4 a 15  $\mu$ L dentro del mesencéfalo, puente y bulbo unilateral y obtuvieron siempre un incremento de la actividad eléctrica adyacente a la inyección y en la mayoría de los casos de la corteza cerebral, que se caracterizaba por un patrón de espigas de 800  $\mu$ V de amplitud en ambos hemisferios y que podía progresar a un registro hipsincrónico generalizado de alta frecuencia similar al que se observa en crisis convulsivas. La misma aplicación de penicilina en el tálamo produjo efectos diferenciales si la inyección se aplicaba en núcleos específicos o

en núcleos inespecíficos del tálamo, sin embargo, los efectos casi nunca se propagaron a la corteza cerebral.

Jinnai en 1969 demostró que la lesión de la FRM antagoniza el efecto convulsivante del pentilinetetrazol. Wada y Sato en 1975 incrementaron el umbral para producir *kindling* por estimulación eléctrica del núcleo amigdalino al lesionar la FRM.

Sin embargo, existe información que resta importancia al papel que juega la FRM en el origen de las crisis tónico clónicas generalizadas.

Browning (1985) demostró que la lesión bilateral de la porción rostral de la FRM no produce efecto sobre las crisis generalizadas producidas por administración sistémica de pentilinetetrazol, de bicuculina o por electrochoque máximo.

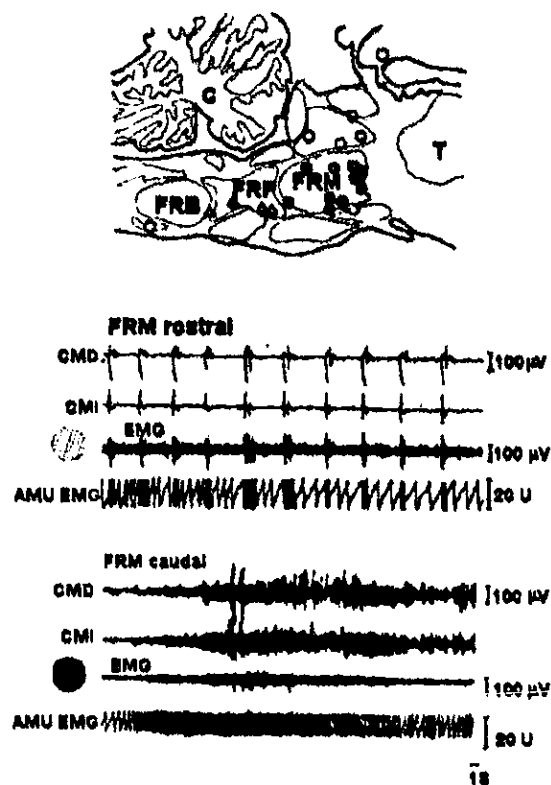
Por otro lado, el mismo Browning (1985) al lesionar el núcleo *reticularis pontis oralis* de la formación reticular pontina inhibió el componente tónico de las crisis producidas por electrochoque máximo o por pentilinetetrazol; pero no afectó las crisis mioclónicas producidas por electrochoque (por estimulación corneal) o las crisis mioclónicas producidas por pentilinetetrazol.

Estos hallazgos conceden a la formación reticular pontina un importante papel en el origen de las crisis tónicas, no así para las crisis clónicas.

Esta hipótesis fue modificada por el mismo Browning en 1987, cuando se determinó que las crisis clónicas por estímulo audiógénico podían también ser inhibidas por lesión de la formación reticular pontina.

De acuerdo a Browning (1987) las crisis clónicas se pueden dividir en dos tipos. Tipo I (clonus de cara y pata anterior) y tipo II (clonus de

correr y brincar). El clonus tipo I está asociado con las crisis producidas por electrochoque mínimo (estimulación corneal) y con la aplicación de pentilinetetrazol en una acción directa sobre la corteza. El clonus tipo II y las crisis tónicas podrían estar asociadas al efecto del electrochoque máximo o de agentes convulsivantes sobre las estructuras del tallo cerebral.



**Figura 2.** La aplicación selectiva de pentilinetetrazol utilizando cánulas push-pull produjo efectos diferenciales sobre el tallo cerebral. Los círculos blancos denotan los sitios donde no hubo efecto convulsivo, los triángulos muestran los sitios donde se obtuvieron husos de sueño e hipotonía, los círculos con diagonales muestran los sitios dentro de la formación reticular mesencefálica donde se produjeron crisis mioclónicas como se muestra en la parte superior del registro EEG y EMG. Finalmente los círculos oscuros muestran los sitios que produjeron CTCG. CMD (corteza motora derecha), CMI (corteza motora izquierda); (Velasco 1985).

También otras estructuras no reticulares han sido implicadas en el origen de las crisis generalizadas, por ejemplo Garant y Gale (1983) usando un modelo de ratas atenuaron el componente clónico de las crisis generalizadas producidas por bicuculina, al lesionar bilateralmente la sustancia negra con ácido kainico.

En un modelo de *kindling* en ratas un efecto similar fue obtenido por McNamara (1984) al lesionar bilateralmente la sustancia negra.

Reforzando el papel de la sustancia negra, Iadarola y Gale (1982) inhibieron las crisis tónicas en extensión de patas anteriores producidas por electrochoque máximo al aplicar gama vinil GABA (inhibidor irreversible de la GABA transaminasa) en esta estructura.

Además de la FRM, pontina y la sustancia negra, otras estructuras del tallo cerebral como son el *locus coeruleus* o el núcleo del raqué han sido implicadas en la supresión de las crisis tónico clónicas generalizadas (Feinstein 1989).



## **2.- El modelo de epilepsia con penicilina**

**En la clasificación de Fisher (1989), los modelos experimentales para crisis tónico clónicas generalizadas incluyen:**

- **Crisis tónico clónicas de predisposición genética.**

**Por ejemplo: Babuino fotosensible, crisis audiogénicas en ratones, ratones tambaleantes y ratones con crisis prono, ratas con epilepsia prono, gerbo mongol, Drosophila agitante y miscelánea genética de animales con crisis prono.**

- **Crisis tónico clónicas por electrochoque máximo.**
- **Crisis tónico clónicas por agentes convulsivantes sistémicos.**

**Por ejemplo, antagonistas inhibitorios como el pentilinetetrazol, la penicilina sistémica, la bicuculina y la estricnina. Agonistas excitatorios como el ácido kaínico, el quisqualato, el NMDA. Agonistas colinérgicos como la pilocarpina**

- **Crisis tónico clónicas por trastornos metabólicos.**

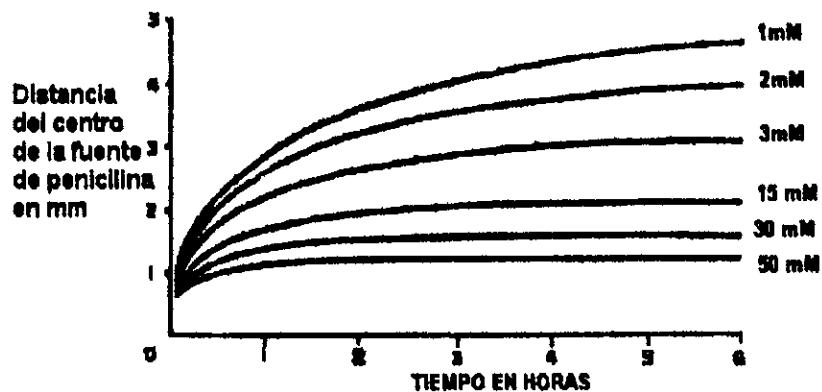
**Por ejemplo: oxígeno hiperbárico e hipercapnia.**

**Según Fisher (1989) de los anteriores modelos de epilepsia, el de electrochoque máximo y del uso del pentilinetetrazol sistémico son los dos modelos más utilizados para producir crisis tónico clónicas generalizadas. Sin embargo, para esta tesis se seleccionó a la penicilina porque es uno de los agentes convulsivantes mejor estudiados y se sabe que actúa sobre el complejo receptor GABA-A inhibiendo su función (Pockberger 1984, Chatt y Ebersole 1988), también se ha caracterizado su acción en neuronas aisladas (Ayala y Vasconseto 1970; Wong y Prince 1979).**

**Al plantear un modelo de epilepsia experimental que utilice un agente convulsivante, como en este caso es la penicilina, se deben tener en consideración los siguientes aspectos: 1. La vía de administración (sistémica o local). 2. El vehículo y sistema de dilución (en general se intenta obtener una solución lo más parecida al medio interno). 3. La preparación y condiciones de experimentación del animal (es deseable evitar el uso de sustancias como los relajantes musculares y es preferible un modelo con libertad de movimiento). 4. La capacidad de diseminación del agente convulsivante (la velocidad de diseminación del agente permitirá determinar el sitio de acción del mismo). 5. El tipo de registro a obtener determinará las variables a medir, así, para estudios *in vivo* generalmente son EEG, EMG y AMU. 6. El mecanismo de acción del fármaco sobre un sistema inhibitorio, excitatorio o ambos; la mayoría de los agentes convulsivantes actuales explican su efecto porque actúan sobre diferentes sistemas de neurotransmisores, afectan la conductancia iónica o bloquean el metabolismo energético neuronal (Meldrum 1994).**

**Se debe considerar que la penicilina sódica cristalina denominada benzilpenicilina sódica o penicilina G sódica, es un antibiótico obtenido del hongo *Penicillium chrysogenum*. Su fórmula se puede ver en la Figura 3 A. Tiene un peso molecular de 356.38. Una unidad Internacional de penicilina equivale a 0.6  $\mu\text{g}$  y 1 mg de penicilina equivale a 1670 UI. Es muy soluble en agua, en solución salina isotónica y en solución glucosada. Su coeficiente de difusión ha sido descrito entre 0.72 mm/hr para una solución de 840 mM sobre la corteza cerebral de gatos (Goldenshon y Salazar 1986) y 1.5 mm/hr también sobre la corteza cerebral de mamíferos (Noebels y Pedley 1977) y su curva de distribución**

depende de su concentración y ha sido obtenida por Salazar en 1980 (Goldenshon y Salazar 1986) (Gráfica 1).



**GRAFICA 1**

El efecto convulsivo de la penicilina fue descubierto en los años cuarenta al ser aplicada tópicamente sobre la corteza cerebral como antibiótico profiláctico en pacientes sometidos a cirugía cerebral (Walker 1947), desde entonces ha sido empleada para reproducir crisis parciales simples, crisis mioclónicas, crisis tónico clónicas generalizadas y ausencias típicas (Fisher 1989).

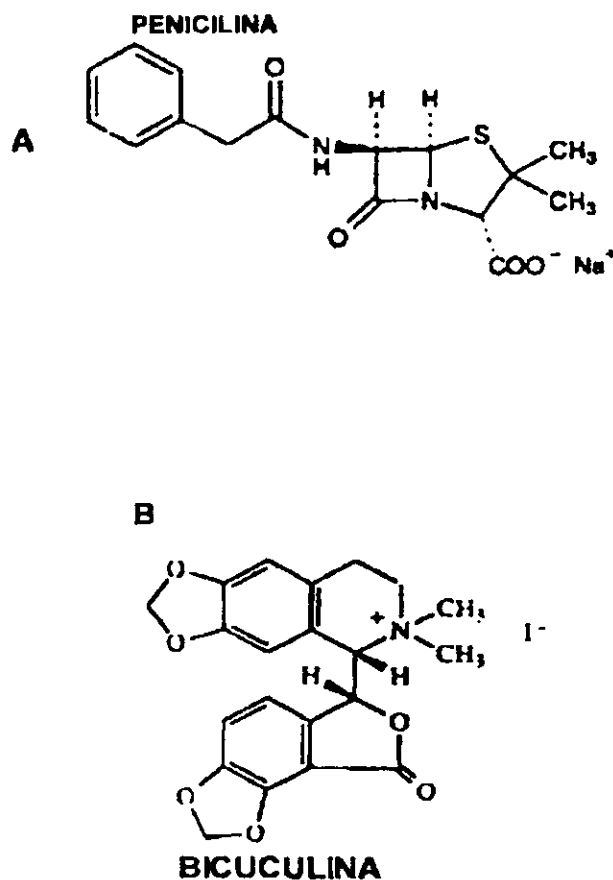


FIGURA 3

Actualmente, el uso de la penicilina como agente convulsivante tiene variaciones importantes en las vías de administración y las dosis empleadas, sin embargo, el mecanismo de acción de la penicilina como agente convulsivante puede explicarse sobre la base de dos efectos fundamentales; por un lado, cambios de despolarización en la membrana neuronal y por otro bloqueo del efecto de la acción del ácido gama aminobutírico (GABA).

En 1967 Prince pudo determinar en un modelo de gatos anestesiados y relajados, que la aplicación de penicilina 425 mM en un

cotón sobre la corteza cerebral producía un foco de descargas epileptiformes corticales cada vez que se estimulaba eléctricamente el grupo de los núcleos ventrolaterales del tálamo. Mediante registros intracelulares y extracelulares se pudo determinar que existían cambios de despolarización (depolarization shift DS) y potenciales postsinápticos inhibitorios (PPI) asociados a las descargas corticales. Prince registró 200 neuronas dentro del foco epiléptico y encontró 152 de ellas con DS y 48 con PPI. También registró 82 neuronas de 3 a 8 mm fuera del foco epiléptico donde registró 16 células con DS y 66 neuronas con PPI. Prince consideró que en un foco epiléptico producido por penicilina se origina inicialmente una fase de inhibición seguida de una fase de despolarización que se propaga a las neuronas circundantes primero con PPI luego con DS. Por este efecto la penicilina puede reclutar células circundantes al foco original.

Anteriormente, Ayala en 1971 había determinado un incremento en la excitabilidad del receptor de tensión del cangrejo sometido a diferentes soluciones de penicilina (8.5 a 85 mM). Determinó que la despolarización de la membrana era directamente dependiente de la concentración de penicilina, por registro intracelular determinó corrientes de hiperpolarización que antecedieron a una lenta despolarización. Con soluciones de penicilina de 8.5 a 17 mM observó un incremento inicial del potencial postsináptico excitatorio (PPE) con una rápida declinación en su amplitud.

En 1979 Wong y Prince aplicaron penicilina en dos diferentes concentraciones 3.4 y 150 mM, la primera en el baño donde se encontraba una rebanada de hipocampo de cobayo mientras que la segunda concentración fue aplicada directamente sobre la porción CA1 del

hipocampo. En esta estructura se introdujeron microelectrodos en el soma y en las dendritas de las células piramidales para producir secuencias de PPE y PPI por estimulación ortodrómica. Los efectos de la aplicación de penicilina no difirieron por la concentración ni por la vía de administración. Se pudo comprobar que la penicilina no produjo cambios intradendríticos del potencial de reposo ni en el umbral del potencial de acción. En cambio, se pudo determinar que la penicilina produjo un lento decaimiento de los PPE evocados por el estímulo eléctrico y que bloqueó los PPI. También se pudo observar que después de la aplicación de penicilina, la estimulación ortodrómica de las neuronas piramidales de CA1 era altamente eficaz en producir ráfagas de disparos en las dendritas. Wong y Prince consideraron estos cambios debidos a la acción de la penicilina mediados por el GABA y que la desinhibición que la penicilina producía liberaba un potente mecanismo de amplificación postsináptica que denominaron “ráfagas de disparo dendríticas” y que está asociado a la generación de DS.

McDonald y Barker en 1977 utilizaron un cultivo de neuronas de médula espinal de ratones y aplicaron penicilina 300 mM iontoforéticamente y pudieron comprobar el bloqueo selectivo del efecto postsináptico inhibitorio mediado por GABA (probaron también glutamato, glicina y beta-alanina) sin que este agente afectara las propiedades de la membrana celular o de la conductancia al cloro.

Sin embargo, De Lorey en 1994, menciona que al utilizar penicilina se produce bloqueo de los canales de cloro del complejo receptor GABA-A. Según De Lorey, las cargas negativas de la molécula de la penicilina interactúan con las con las cargas positivas de los residuos aminoácidos de las proteínas del canal de cloro, impidiendo así la hiperpolarización.

## **II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.- Limitación de los modelos de crisis convulsivas**

**Existen discrepancias tanto en la ubicación anatómica de una estructura generadora de crisis dentro del tallo cerebral como en los mecanismos implicados en la producción de éstas; estas diferencias dependen fundamentalmente del agente empleado para producir las crisis (pentilenetetrazol, penicilina, bicuculina, estimulación eléctrica de tallo cerebral, etc.) y del tipo de preparaciones utilizadas (aplicación sistémica o tópica, perfusión por cánulas push-pull, utilización de polvo, uso de soluciones a diferentes concentraciones y volúmenes). Generalmente se han empleado animales anestesiados o paralizados que permiten sólo la observación de fenómenos EEG o de AMU sin su correlato conductual.**

**El mecanismo de acción de algunos métodos convulsivantes no está claramente definido, presumiéndose la participación de otras condiciones en la producción de crisis: como la difusión del agente o la alteración de las constantes fisiológicas de pH, osmolaridad y contenido de electrolitos.**

**El papel del tallo cerebral en el origen de las crisis tónico clónicas generalizadas debe ser revisado de manera sistemática tomando en consideración los siguientes aspectos:**

- 1.- Ubicación de un área crítica epileptógena por medio de la estimulación comparativa de estructuras reticulares y no reticulares del mesencéfalo, puente y bulbo.**
- 2.- Descripción de un patrón convulsivo conductual y electroencefalográfico.**

**3. - Uso de un agente convulsivante bien caracterizado en su mecanismo de acción y en sus propiedades de difusión.**

**4. - Definición de un mecanismo de propagación del efecto convulsivo.**

Para ello, el agente convulsivante propuesto en este estudio es la penicilina sódica cristalina en solución.

No obstante la abundante información que existe sobre epilepsia experimental producida por penicilina, es necesario revisar algunos datos concretos sobre este modelo específico.

La penicilina aplicada tópicamente tiene una variación en la dosis desde 1.7 mM (1UI/ $\mu$ L)(Gloor 1977) hasta 1700 mM (1000 UI/ $\mu$ L) (Ralston 1965). Estas concentraciones han sido suficientes para producir crisis parciales o generalizadas. La penicilina también ha sido aplicada en forma sistémica a razón de 325 000 UI/Kg. de peso para producir actividad epileptiforme en gatos (McCandless 1992).

Además de la diversidad de concentraciones utilizadas en los modelos de penicilina, sus efectos se explican por diferentes mecanismos: primero: por disminución de la conductancia al cloro determinada por un bloqueo de sus canales (Hoechner 1976, De Lorey 1994); segundo: por un bloqueo de los PPI mediados por GABA que se asocia a un cambio de despolarización (DS) (Prince 1967, Wong y Prince 1979, McDonald y Barker 1977) y tercero: por una alteración en el gradiente de concentración del sodio (Ayala 1970). De acuerdo a lo anterior, los efectos de la aplicación de penicilina podrían ser replicados utilizando un agente antagonista gabaérgico específico como lo es la bicuculina, por el efecto directo sobre el receptor GABA-A. El análisis de los resultados permitiría encontrar efectos similares o diferenciales entre la actividad convulsiva producida por penicilina y por bicuculina.



La bicuculina utilizada como agente convulsivante es propiamente el metilodato de bicuculina que se asocia a un ión de yodo. Índice Merck 12<sup>th</sup> Ed. No.1250. Su fórmula se puede ver en la figura 3B. Tiene un peso molecular de 367.36, un pKa 4.84. Se encuentra como alcaloide natural en la *Dicentra cucullaria*, *Adlumia fungosa*, *Fumariaceae* y otros tipos de hongos de la especie *Corydalis*. Es muy soluble en agua y etanol. Es un antagonista GABA-A específico. Tsutsui en 1992 utilizó de 80 a 120 nanogramos de bicuculina 272 mM en el colículo inferior de ratas con epilepsia audiogénica refleja y reprodujo crisis generalizadas.

## 2. - Relevancia del problema

Existe la probabilidad de que la formación reticular del tallo cerebral y en especial la FRM sea una estructura especialmente implicada en el origen y en la propagación de las crisis tónico clónicas generalizadas. Es probable que otras estructuras del tallo cerebral pudieran también estar involucradas en este proceso.

Las variaciones de aproximaciones metodológicas tanto para modelo de epilepsia seleccionado como para el agente convulsivante utilizado complican la obtención de una información clara.

La existencia de una región del sistema nervioso central bien delimitada que sea el origen de un proceso como lo es un evento epiléptico generalizado, además de plantear una pregunta de interés funcional, orienta a pensar en la posibilidad de modular esta área con fines médicos.

El paso inicial de aproximación al problema es el delimitar un área del sistema nervioso central que esté implicada en la producción de crisis tónico clónicas generalizadas. Para ello se plantea un modelo

**experimental *in vivo*, que utilice un agente convulsivante específico en el que se puedan caracterizar sus efectos.**

### **III HIPOTESIS**

**La aplicación tópica de penicilina sódica en solución producirá crisis tónico clónicas generalizadas cuando se administre en la formación reticular mesencefálica y no en otros sitios.**

**La aplicación tópica de bicuculina en la formación reticular mesencefálica producirá crisis tónico clónicas generalizadas similares a las producidas por penicilina.**

### **IV OBJETIVOS**

- **General:**

**Obtener una preparación *in vivo* para la producción y registro de crisis convulsivas generalizadas en gatos adultos mediante el uso de un agente convulsivante como la penicilina aplicado en un área específica del tallo cerebral.**

- **Específicos:**

- 1. Localizar un área crítica epileptógena dentro del tallo cerebral del gato utilizando una solución de penicilina aplicada en forma tópica sobre estructuras reticulares y no reticulares.**

- 2. Obtener una curva dosis–respuesta del efecto convulsivo de la penicilina sódica isoosmolar (212 mM) aplicada tópicamente en el tallo cerebral.**

- 4. Determinar el efecto de la aplicación de penicilina sódica sobre la AMU cortical, reticular y muscular en un modelo *in vivo* de epilepsia en gatos.**

**5. Determinar el efecto de la aplicación de bicuculina (377 $\mu$ M) sobre el área crítica epileptógena en el tallo cerebral.**

## **V MATERIAL Y METODOS**

### **1. - Descripción de la preparación**

**Se utilizaron 38 gatos de ambos sexos cuyo peso varió entre 2.8 y 3.6 kg. Al momento de la aplicación del agente convulsivante, estos animales se encontraban sin efecto anestésico y en movilidad parcial. Para alcanzar este objetivo se realizó una preparación en dos fases. La primera fase se llevó a cabo una implantación de electrodos y cánulas guía a los sitios "blanco", en esta fase también se elaboró un sistema de fijación por medio de barras para posicionar la cabeza del animal en coordenadas estereotácticas sin necesidad de anestesarlo.**

**En la segunda fase se efectuaba un registro conductual y electrofisiológico antes y después de la aplicación del agente convulsivante.**

**Primera Fase. Bajo anestesia general con pentobarbital sódico a dosis de 20 mg/Kg. de peso por vía intraperitoneal, se colocó al animal en un aparato de estereotaxia. Se incidió la piel de la calota sobre la línea media y se desinsertaron parcialmente los músculos temporales. Se expuso la calota craneal y se moldeó una cúpula de plástico que se fijó al cráneo por medio de tornillos de acero inoxidable que cumplieron tanto una función de fijación como de registro dado que al pasar el espesor del hueso quedaban en contacto con la corteza supra-silviana anterior y posterior en ambos lados. También se efectuaron dos trépanos sobre el hueso frontal a cada lado de la línea media para poder colocar en cada uno de ellos una bola de plata para el registro de la corteza sigmoidea.**

Adicionalmente, se implantaron en los músculos del cuello alambres de acero inoxidable totalmente aislado excepto en sus puntas en una longitud de 3mm, cada alambre tenían una longitud de 2 cm y estaba soldado a un cable proveniente de un conector Amphenol.

En el grupo inicial de 14 gatos en los que se inyectó penicilina 850 mM, se efectuó el cálculo estereotáxico de la ubicación de diferentes estructuras dentro o fuera de la formación reticular del tallo cerebral. Hacia las coordenadas específicas de cada estructura se dirigieron dos cánulas guías de 16-gauge (diámetro exterior de 1.65 mm y diámetro interior de 1.19 mm) con mandril diseñadas *ad-hoc*, que se fijaron a la cúpula de plástico con cemento acrílico. Estas cánulas impidieron modificar sustancialmente las coordenadas de los ejes antero-posterior y lateral y terminaban 15 mm arriba del sitio blanco elegido sin llegar a afectarlo y evitaban la diseminación del agente convulsivante en el trayecto al blanco.

Un segundo grupo de animales fue sometido al efecto de una concentración isotónica de penicilina (n=11), de este segundo grupo de gatos, ocho fueron sometido al efecto de bicuculina en el lado contrario a donde se había aplicado un tratamiento previo de penicilina. Un tercer grupo de animales sometidos al efecto exclusivo de la bicuculina (n=6), las bolas de plata fueron sustituidas por dos electrodos bipolares concéntricos de registro de AMU en la corteza frontal. Un cuarto grupo de animales fue sometido a la acción conjunta de penicilina isoosmolar y bicuculina (n=3) y en un quinto grupo de gatos se aplicó penicilina y muscimol de un lado y penicilina y bicuculina del otro lado (n=3). En un sólo animal se aplicó solución salina hiperosmolar por altas concentraciones de sodio (similar a la utilizada en la dilución de

penicilina hiperosmolar). También en cada uno de estos grupos se efectuaron dos trépanos suboccipitales que fueron utilizados para la introducción de electrodos de registro de AMU dirigidos oblicuamente al sitio adyacente de aplicación de penicilina o bicuculina.

Tanto los electrodos corticales (tornillos de acero inoxidable) como los electrodos musculares fueron soldados a un sistema de conexión Amphenol por medio de alambre de cobre aislado. Este conector se fijó a la cúpula de plástico con cemento acrílico.

Finalmente, en esta primera fase, se colocaron unas barras de referencia esterotáxica (David-Kopft-Estereotactic Rods) que permitieron establecer un sistema de fijación unido a la cúpula de plástico en la misma posición inicial sin utilizar las referencias óseas habituales para el aparato esterotáxico. Figuras 4, 5, 6 y 7.

Segunda Fase. Siete días después, con el animal despierto se montó la cabeza del gato en posición esterotáxica utilizando para ello el

FIGURA 4



FIGURA 5



FIGURA 6



FIGURA 7

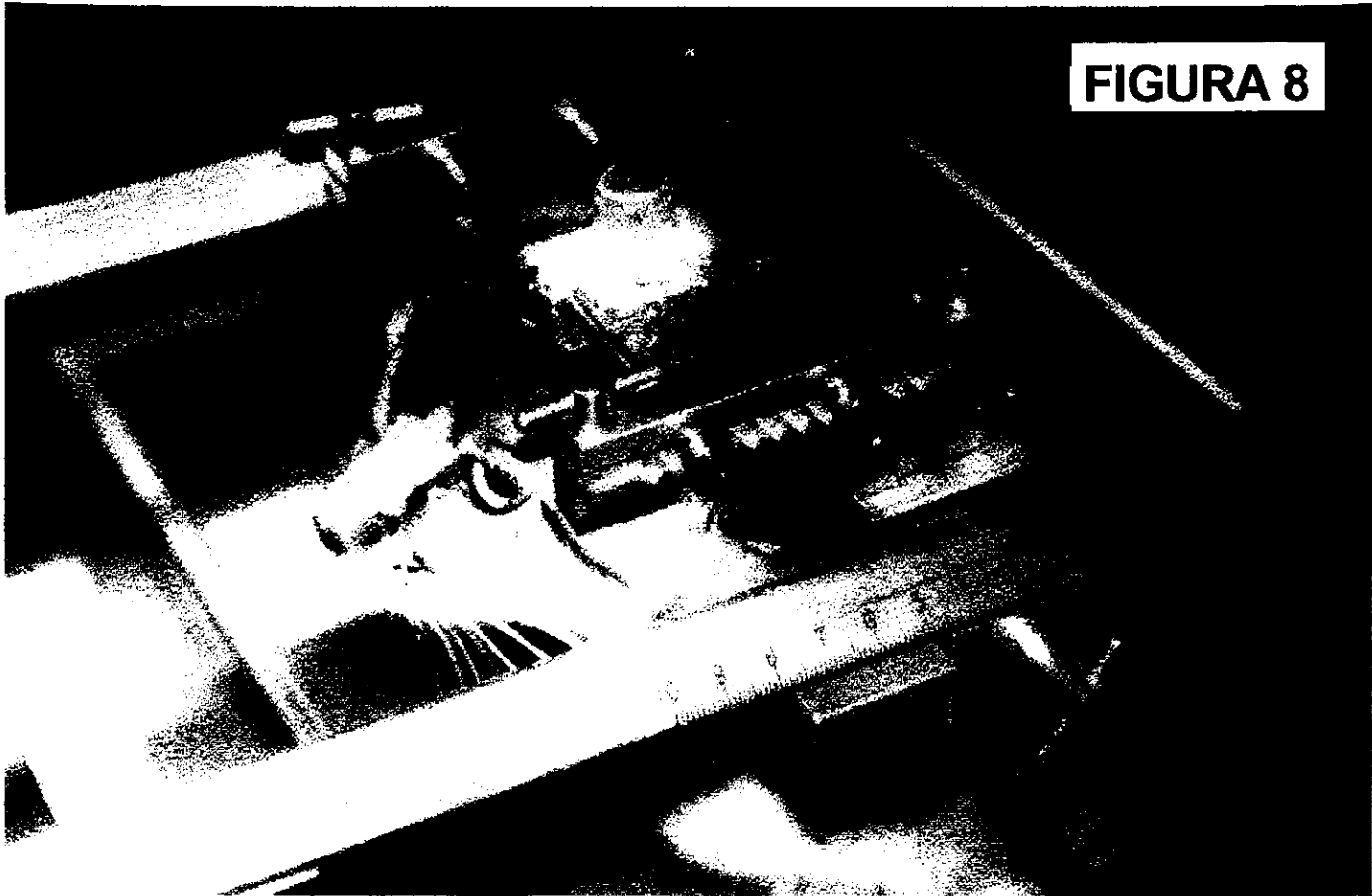
**Figura 4. Vista frontal de la colocación inicial del gato en un sistema estereotáctico David-Kopft, esta fase se efectúa bajo anestesia general con tiopental**

**Figura 5. Bajo Técnica estéril se efectúa una apertura de la calota sobre la línea media y se moldea una cúpula de acrílico que se fija con tornillos de acero inoxidable, los mismos servirán como electrodos corticales de registro.**

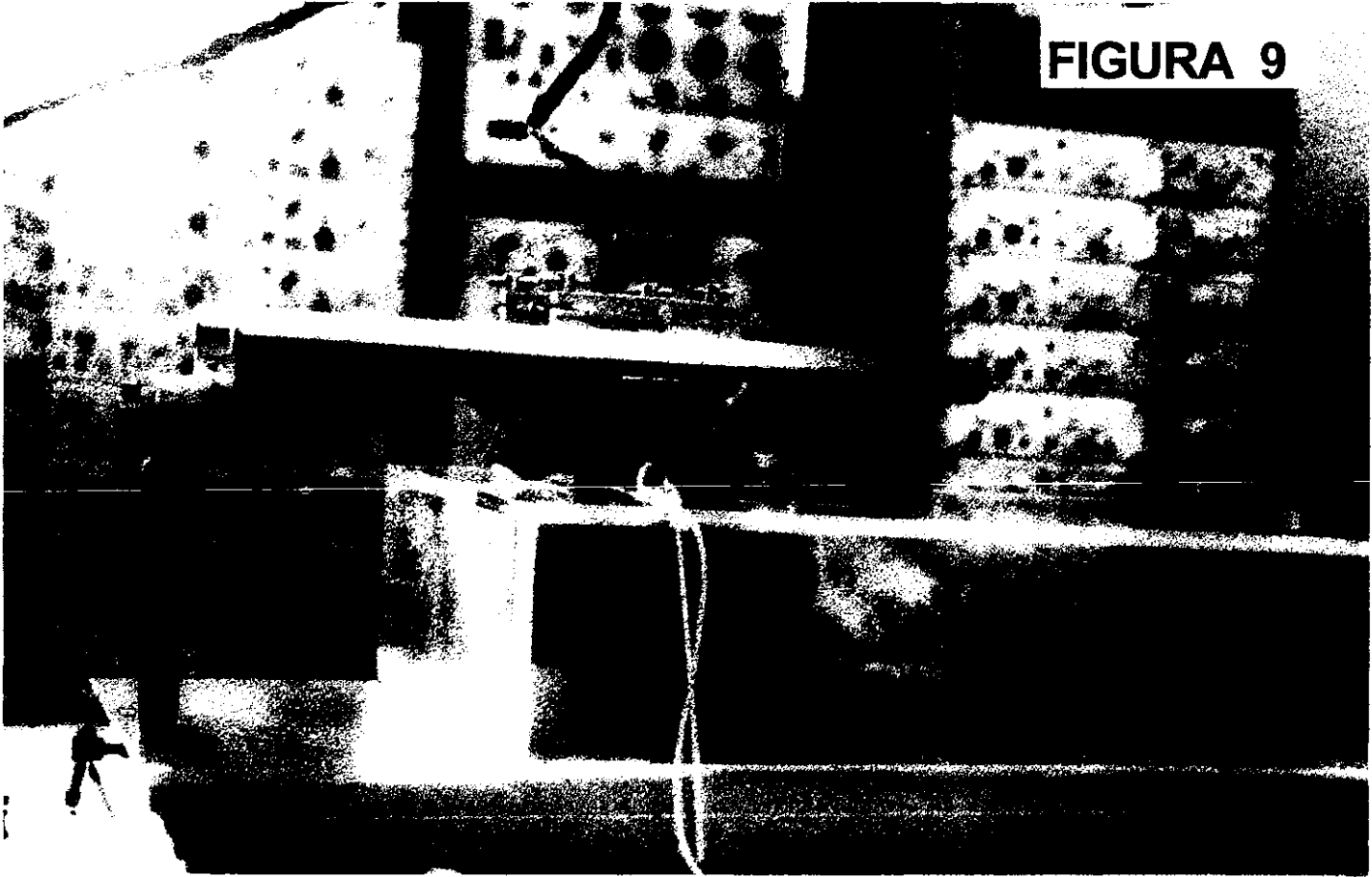
**Figura 6. Fijación del conector Amphenol y del conexionado a los electrodos – tornillos y a los electrodos de registro EMG.**

**Figura 7. Vista superior de los tubos de sujeción de acrílico para la recolocación en la fase II del procedimiento.**

**FIGURA 8**



**FIGURA 9**



## **2. - Inyección de dosis supramáximas de penicilina para determinación de un área crítica epileptógena.**

Para lograr este objetivo se inyectaron 14 animales en forma programada, en 32 sitios específicos del tallo cerebral que incluían diversas áreas de la formación reticular desde el mesencéfalo hasta el bulbo raquídeo, así como núcleos específicos no reticulares del tallo cerebral. En vista de que la aplicación tópica de penicilina en solución varía de 1.7 mM a 1700 mM, como se describió en el marco teórico, se seleccionó una concentración media de 850 mM que correspondía a 500 UI por  $\mu\text{L}$  (pH de 6.8 a 7.2, que contenía 484 mEq de Na /L y con una osmolaridad de 979 mOsm). Una vez seleccionado el sitio de inyección se calculaban las coordenadas del sitio blanco y se aplicaba  $0.5\mu\text{L}$  a una velocidad de  $0.1\mu\text{L}$  en 5 segundos. La solución fue inyectada con una jeringa Hamilton (Hamilton Co, Reno NV). Posteriormente se iniciaba un registro conductual, EEG y EMG que se continuaba por 30 minutos, tomando en cuenta que de acuerdo a esta concentración la velocidad de difusión de la penicilina era de menos de 1 mm por hora.

Si en 30 minutos no se obtenía una crisis tónico clónica generalizada se proseguía aplicando dosis subsecuentes de penicilina hasta que el efecto convulsivo era alcanzado o se llegaba a un máximo de 1000 UI del agente convulsivante en  $2.0\mu\text{L}$ . Al final de cada experimento el sitio era marcado con  $0.5\mu\text{l}$  nitrato de plata al 10%.

## **3. - Determinación de Curva Dosis – Respuesta a Penicilina.**

Una vez determinado el sitio crítico epileptógeno se procedió a inyectar en 11 animales una solución de penicilina 212 mM que contenía



125 UI de penicilina /  $\mu\text{L}$  y que fue ajustada a parámetros fisiológicos de 322 mOsm/l, pH de 6.8 a 7.2 y concentración de sodio de 150 mEq/L.

Esta solución se utilizó para determinar la dosis umbral convulsiva, se administraron sucesivamente 0.1  $\mu\text{L}$  de solución cada 10 minutos hasta obtener una crisis generalizada tónico clónica o alcanzar 1.0  $\mu\text{L}$ . Durante este proceso se observó la relación existente entre los diferentes patrones de crisis y la cantidad de penicilina aplicada en el sitio crítico epileptógeno. También se elaboró una curva dosis-respuesta farmacológica, cuantificando en una escala logarítmica la dosis administrada contra el porcentaje de observaciones que produjeron una crisis tónico clónica generalizada.

Para lograr este objetivo, se preparó a los animales como anteriormente se describió, adicionando, un registro del EEG y de la AMU del sitio adyacente a la inyección y de la corteza sigmoidea anterior ipsilateral a la aplicación de la inyección. El registro de la AMU fue realizado a través de electrodos de acero inoxidable concéntricos, bipolares, elaborados de alambre de 25 gauge (0.51 mm de diámetro), aislado en toda su extensión excepto en un anillo distal de 2 mm de ancho y en la punta, que fue afilada electrolíticamente a un tamaño de 80  $\mu$  (40 kilohmios de impedancia) insertados dentro de una cánula de acero inoxidable, también aislada en toda su extensión excepto en un anillo de 2 mm de ancho en la punta. La distancia entre la punta del electrodo y el anillo de la cánula fue de 2 a 3 mm. Los registros fueron amplificados y filtrados a través de un filtro de banda de 3000 Hz acoplado a un "stair cage generator" y a un monitor de audio.

Para cuantificar la AMU se utilizó un discriminador de ventana "Smichdt trigger" que seleccionaba aquella actividad que sobrepasaba el

100% del ruido de fondo del registro y que era presentada como una escalera, en la que cada inicio de escalera significaba una cuenta de 25 unidades con estas características (Velasco 1975). De la misma manera se registró la AMU del EMG.

Con objeto de determinar la relación entre el sitio inyectado (por coordenadas estereotáxicas AP, lateral y altura) y el patrón de crisis obtenido (mioclonía focal, mioclonía generalizada, crisis tónica o crisis tónico clónica) fueron calculados las medias para cada coordenada estereotáxica, cada valor medido en milímetros correspondía a un patrón específico de crisis. De esta forma se trató de determinar si el efecto convulsivo dependía de la dosis de penicilina o del sitio inyectado. Para ello se utilizó una prueba de Friedman que determina las diferencias generales entre los valores. Se aplicó también la prueba estadística de Kruskal - Wallis al considerar que la caracterización de los diferentes tipos de crisis está conformada por variables discontinuas.

#### 4.- Determinación de la relación entre el EEG, EMG y la AMU

Para este análisis se eligieron cinco de los doce animales inyectados con penicilina isoosmolar (212mM) que al momento de determinar la curva dosis - respuesta de penicilina se registraba en ellos también la actividad multiunitaria de la zona adyacente a la inyección (menos de un mm), al tiempo que se registraba la actividad de la corteza sigmoidea ipsilateral y de los músculos del cuello. Como ya se mencionó, la AMU era representada en unidades de escalera (Figura 15). Se efectuó un análisis de correspondencia temporal entre la actividad AMU reticular, la AMU cortical y la AMU muscular, considerando como tiempo cero la cima de una espiga EEG cortical. Para este registro se aumentaba la velocidad de corrimiento del papel del polígrafo de 5 mm / seg a 50 mm /

seg y se tomaba una muestra de las espigas más representativas. Entonces se midieron en el registro gráfico los valores promedios del incremento o del decremento de los peldaños de cada escalera en cada una de las AMU desde 500 ms antes hasta 500 ms después de la cima de la espiga y se compararon estos incrementos o decrementos entre ellos. Se cuantificaba cada 100 ms el número de unidades (cada escalera representa 25 unidades) y se determinaban los cambios de cada 100 ms con respecto al resultado de los 100 ms previos.

El análisis estadístico que se aplicó en este caso fue una prueba de t de student.

#### **5.- Determinación de la Curva Dosis-Respuesta de Bicuculina en animales previamente tratados con penicilina**

Se intentó reproducir los efectos obtenidos por la aplicación de penicilina en el sitio crítico epileptógeno con la inyección de bicuculina. Para esto, se utilizaron 8 de los 11 animales seleccionados en la elaboración de la curva dosis respuesta de penicilina. Se utilizaron los mismos animales con objeto de tener el mismo control sobre las variables biológicas, para lograr este objetivo se programó el utilizar los mismos animales en los que se inyectaba penicilina sódica en el lado derecho y tres días después inyectar bicuculina en el lado izquierdo.

Para este estudio se utilizaron inicialmente 100 nanogramos de bicuculina 377  $\mu\text{M}$  que presentaba una osmolaridad de 215 mOsm y un pH de 6.6 en un volumen de 0.2  $\mu\text{L}$ . Dependiendo del efecto se aumentó paulatinamente la dosis inyectada hasta que se obtuvo una crisis convulsiva generalizada o se acumulaban 500 nanogramos de bicuculina

en un volumen total de 1  $\mu$ l. Finalmente se construyó una curva dosis-respuesta.

#### **6. Determinación del efecto de bicuculina en animales sin tratamiento previo de penicilina**

Con objeto de observar la diferencia entre los efectos obtenidos por la aplicación de bicuculina en los animales previamente tratados con penicilina de los efectos de la bicuculina en animales sin tratamiento previo se formó un tercer grupo de 6 animales en los cuales se aplicó bicuculina 377  $\mu$ M de las mismas características que la aplicada en el grupo previo. De igual forma se inyectó en las coordenadas estereotáxicas obtenidas como área crítica epileptógena una dosis inicial de 25 nanogramos de bicuculina en 0.02  $\mu$ l cada 5 minutos. Las dosis se fueron sumando hasta obtener una crisis convulsiva tónico clónica o alcanzar 1.0  $\mu$ L. Como en el grupo previo la significancia estadística se investigó aplicando la prueba de Kruskal - Wallis entre los efectos conductuales o electroencefalográficos obtenidos y las dosis aplicadas.

#### **7.- Determinación del efecto sumado de penicilina isoosmolar y bicuculina.**

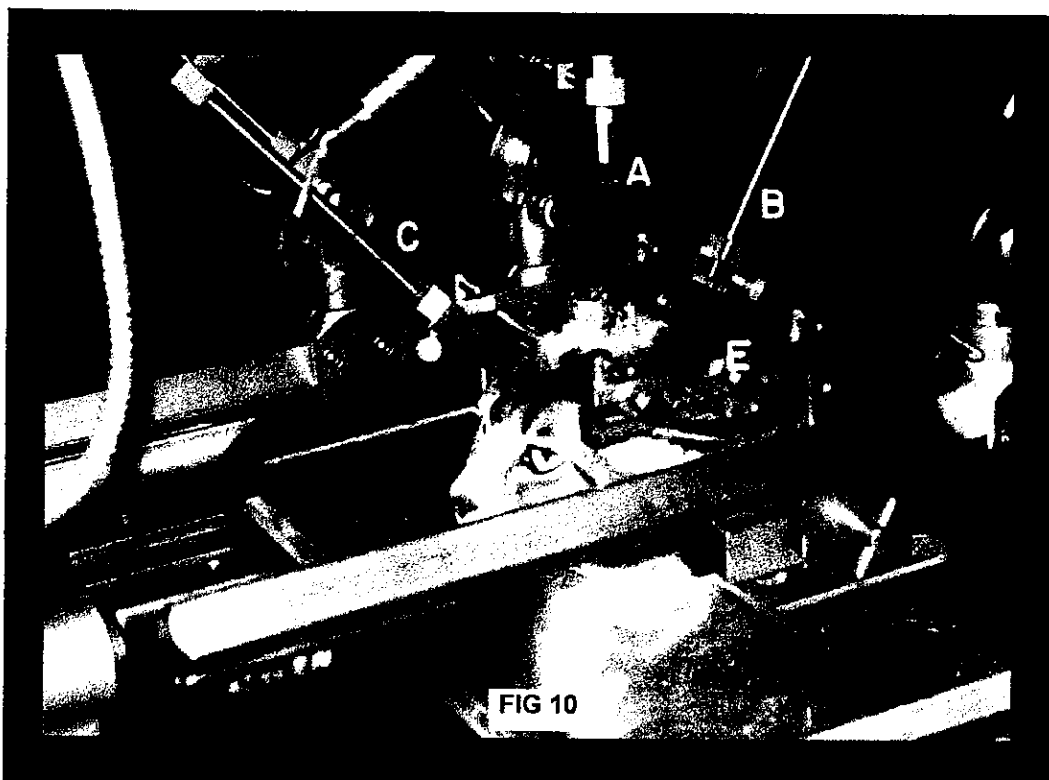
En tres animales se administró la dosis convulsivante 50 (obtenida de la curva dosis - respuesta logarítmica) de penicilina isoosmolar que producía crisis convulsivas sumada a la mitad de la dosis promedio de bicuculina que produjo el mismo tipo de crisis. El volumen inyectado no rebasó 1  $\mu$ L. Los resultados no fueron analizados estadísticamente.

#### **8.- Determinación del efecto de la aplicación de penicilina o de bicuculina sumados al efecto de muscimol.**

**En tres gatos se aplicó en uno de los lados la dosis convulsivante 100 de penicilina adicionada a 100 nanogramos de muscimol. Se efectuaba un registro de 60 minutos. Después de tres días de recuperación, en el otro lado del animal se administraron 500 nanogramos de bicuculina mas 100 nanogramos de muscimol. De igual forma se efectuaba un registro de 60 minutos. Los volúmenes de solución inyectada en ambos casos no rebasaron 1.0  $\mu$ L. Los resultados no fueron analizados estadísticamente.**

**9.- Determinación del efecto de la aplicación de sodio hiperosmolar**

**En un gato se aplicó en dos ocasiones (a cada lado), una solución de cloruro de sodio 484 mEq de Na<sup>+</sup>, que correspondían a la concentración de sodio de la solución de penicilina 850 mM. Los efectos fueron registrados por 120 minutos.**



*Figura 10. Se puede observar en detalle la preparación en donde: A es la jeringa Hamilton montada en la torre estereotáctica e introducida a través de la cánula guía. B y C son los electrodos de registro de AMU sistema reticular y cortical respectivamente. D es el sistema de conexión Amphenol y E es el sistema de recolocación David-Kopft.*

## **10. Control histológico.**

Posterior a cada registro se inyectaba en las coordenadas específicas 0.5  $\mu$ L de nitrato de plata al 10%, una vez que se obtuvieron los registros necesarios en cada gato se inyectaba una dosis intraperitoneal letal de pentobarbital. El animal presentaba un estado de anestesia profunda y finalmente un paro respiratorio. En este momento se efectuaba una toracotomía y se canalizaba la aorta para inyectar solución salina al 0.9% que lavaba el excedente de sangre. Posteriormente se perfundía con formaldehído al 10% y se efectuaba una craneotomía para extraer el encéfalo desde el tallo cerebral. Se mantenía el encéfalo en

formaldehído durante siete días y posteriormente se efectuaban cortes coronales hasta obtener la zona donde el nitrato de plata había marcado más intensamente. Este fragmento de tejido era procesado para incluirse en parafina y cortarse en microtomo a un espesor de 6 micras. Finalmente se teñían los cortes utilizando la técnica de Luxol para poder definir las estructuras del mesencéfalo.

La corroboración del sitio de inyección permitió correlacionar los efectos registrados en cada experimento.

#### **11. Aspectos éticos y de bioseguridad.**

Los animales utilizados fueron procedentes del Servicio Antirrábico "Luis Pasteur", dependiente del DDF y fueron donados y trasladados al Bioterio del Centro Médico Nacional "Siglo XXI". Se manipularon en esta unidad cuatro semanas previas al experimento, tiempo en que fueron alimentados, vacunados y habituados al manejo. La primera fase del experimento se efectuó bajo anestesia general con pentobarbital aplicado intraperitonealmente. En la segunda fase el animal fue sujeto por las barras de acrílico del cráneo lo que evita dolor en el animal manteniéndolo en posición estereotáctica y se colocó dentro de una caja de plástico transparente, de tal forma que el animal estaba despierto y con la cabeza fija. En la mayoría de los casos los animales se habituaron a las condiciones de registro y presentaban un estado de tranquilidad y somnolencia. Una vez obtenido el registro del efecto en caso de crisis generalizadas se inyectaba intraperitonealmente 5 mg de diacepam para controlar las crisis y si el trabajo con el gato específico había concluido se administraba una dosis letal de pentobarbital que produce primero un estado de sueño profundo similar al coma.

## **VI RESULTADOS**

### **1.- Localización del área crítica epileptógena**

En la Figura 11 se muestran los sitios de inyección en 36 experimentos con penicilina sódica cristalina a concentración 850 mM (500 UI /  $\mu$ l) a lo largo de todo el tallo cerebral desde la coordenada A=3.0 hasta P=6.5 del atlas de Snider and Niemer. Las inyecciones se ubicaron en diferentes sitios de la formación reticular y en núcleos específicos del tallo cerebral. Sólo las inyecciones aplicadas en la formación reticular mesencefálica (FRM) produjeron un efecto convulsivo. En un caso la inyección quedó localizada en la porción externa de la FRM y no se obtuvo este efecto. En otros sitios de inyección dentro de la formación reticular pontina (FRP) y en la formación reticular bulbar (FRB) no se consiguió el efecto convulsivo y en su lugar apareció un estado de somnolencia conductual y un registro EEG de husos de sueño.

Dentro del mesencéfalo se inyectó en el colículo superior, en el colículo inferior, en el cuerpo geniculado medial, en la sustancia negra, en el pedúnculo cerebral y en la sustancia gris periacueductal, en ningún caso se obtuvo efecto convulsivo.

Dentro del puente se inyectó PSC en el núcleo del rafé en donde se produjo sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y desincronización EEG. También se inyectó en el pedúnculo cerebeloso superior sin obtener algún efecto.

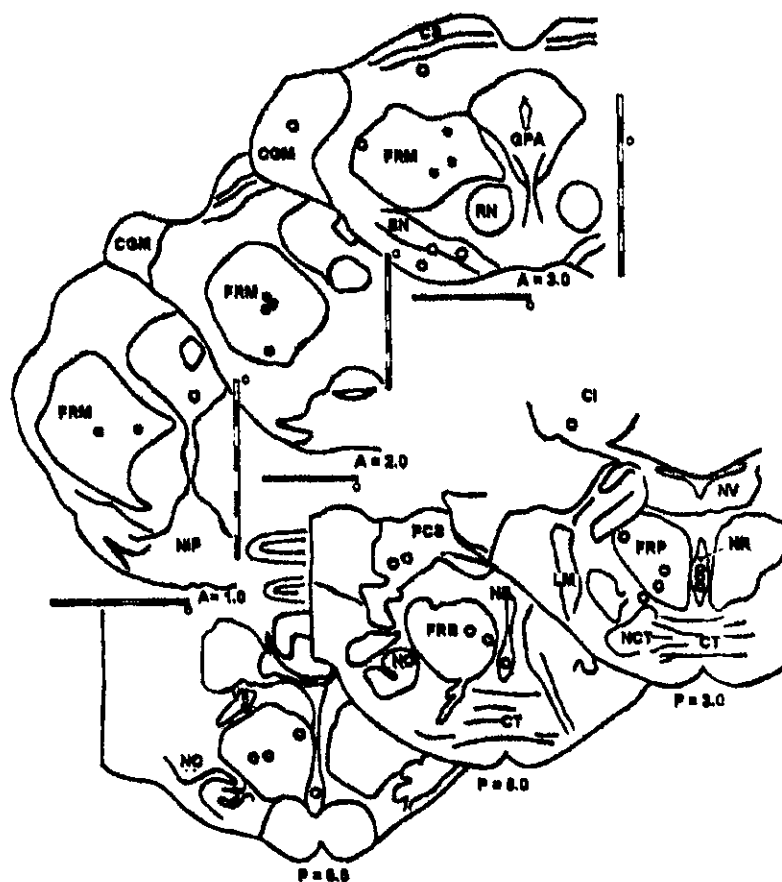
En el bulbo raquídeo se inyectó en el trayecto del núcleo del facial y se obtuvieron espasmos faciales primero episódicos y finalmente un



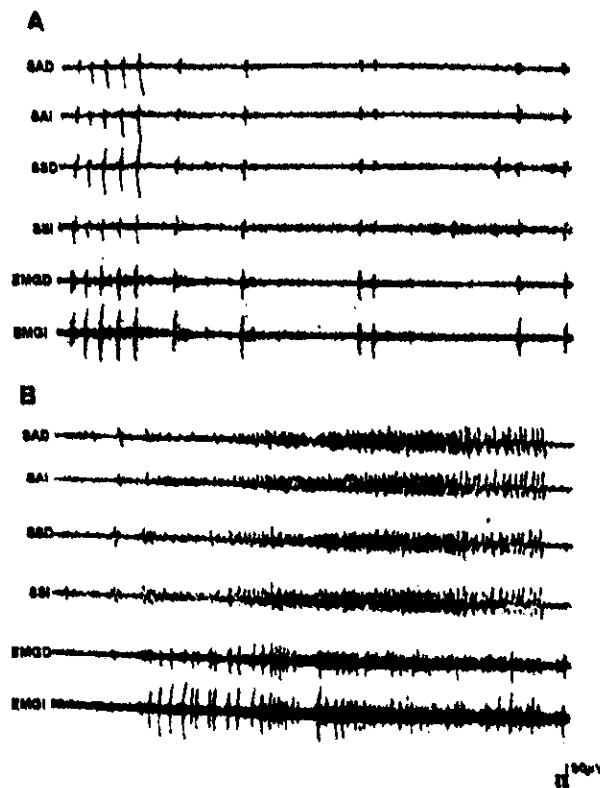
**trismus ipsilateral al sitio de la inyección acompañado de salivación profusa.**

**Dentro del bulbo raquídeo también se inyectaron el núcleo vestibular y el núcleo del rafé sin obtener resultados.**

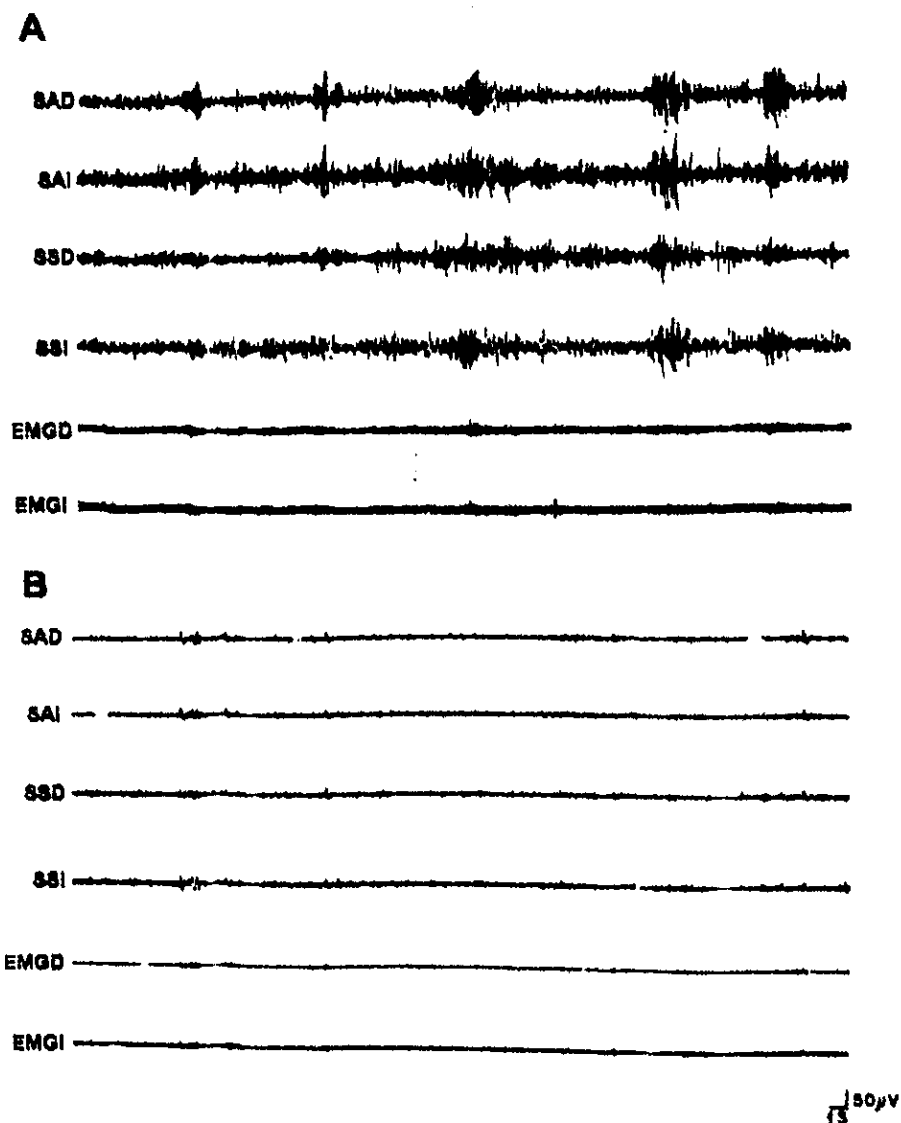
**Después de esta serie de inyecciones se determinaron los rangos de las coordenadas donde la penicilina había producido crisis convulsivas. Para el plano antero-posterior las coordenadas fueron desde anterior 3.0 hasta anterior 1.0, para el plano lateral de 2.0 a 4.0 y para la altura de +1.0 a -4.0, de acuerdo al atlas de Snider y Niemer.**



**Figura 11.** Localización de los sitios inyectados a lo largo del tallo cerebral con penicilina 850 mM. En círculos oscuros se muestran los sitios que produjeron CTGG y en círculos blancos se observan los sitios que no produjeron CTGG. Se pueden observar las coordenadas estereotácticas donde se obtuvieron crisis. FRB (formación reticular bulbar), CGM (cuerpo geniculado medial), CT (cuerpo trapezoidal), CI (colículo inferior), LM (lemnisco medio), FRM (formación reticular mesencefálica), NCT (núcleo del cuerpo trapezoidal), NIP (núcleo Interpeduncular), NO (núcleo olivar), NR (núcleo del raquí), NV (núcleo vestibular), PCS (pedúnculo cerebeloso superior), FRP (formación reticular pontina), RN (núcleo rojo), CS (colículo superior), SN (sustancia negra) y VII (séptimo par).



**Figura 12. (A) Se observa el efecto inicial (5 minutos después de la inyección) en el EEG y en el EMG producido por la aplicación de la penicilina 850 mM en la FRM. Se puede observar la presencia de ráfagas de actividad paroxística EEG acompañadas de descargas musculares y conductualmente se observaron mioclonias generalizadas. (B) En el registro mas tardío (9 minutos después de la inyección) se observa la presencia de actividad generalizada de alta frecuencia y amplitud creciente en el EEG y sincrónicamente se observa actividad incrementada en el EMG correspondiente a CTCG conductuales. SAI ( corteza sigmoidea anterior izquierda), EMGI (EMG de músculos de cuello izquierdos), SSI (corteza suprasilviana izquierda), SAD (corteza sigmoidea anterior derecha), EMGD (EMG de músculos del cuello derechos), SSD (corteza suprasilviana derecha).**



*Figura 13. En (A) se puede observar el efecto EEG de husos de sueño y EMG de hipotonía por la aplicación de penicilina 850 mM en la formación reticular pontina. En (B) se observa la producción de sueño paradójico producido por la inyección de penicilina en el núcleo del rañé pontino. . SAI (corteza sigmoidea anterior izquierda), EMGI (EMG de músculos de cuello izquierdos), SSI (corteza suprasilviana izquierda), SAD (corteza sigmoidea anterior derecha), EMGD (EMG de músculos del cuello derechos), SSD (corteza suprasilviana derecha).*

La inyección de penicilina 850 mM dentro de la FRM produjo crisis convulsivas en 9 de 10 ocasiones. Estas crisis se presentaron siempre con un patrón constante que iniciaba con mioclonias focales contralaterales, generalmente en la cara (vibrisas o músculos orbiculares de los párpados), ocasionalmente en la oreja y rara vez la pata anterior (estas crisis fueron similares a las denominadas por Fisher mioclonus tipo I). Las crisis mioclónicas se presentaban después en el hemicuerpo contralateral para finalmente generalizarse a todo el cuerpo.

Las crisis mioclónicas generalizadas se presentaban en periodos cada vez más cortos hasta observarse ráfagas tan frecuentes que originaban una contracción sostenida o crisis tónica de todo el cuerpo.

Posterior a estos eventos se alternaban las ráfagas de mioclonias con la crisis tónicas y finalmente se presentaba una crisis tónica sostenida de varios segundos de duración seguida de crisis mioclónicas, en ocasiones después de esta secuencia se presentaba un período muy breve de inmovilidad.

La latencia entre la inyección y la presentación del primer evento paroxístico conductual fue en promedio de 2.1 minutos y la latencia para la crisis tónico clónica generalizada fue en promedio de 8.6 minutos.

Como se puede observar en las figuras 12 y 13 se obtuvo un patrón EEG específico de acuerdo al sitio de inyección, los sitios que produjeron crisis convulsivas generalizadas produjeron siempre un patrón EEG de espigas inicialmente aisladas que se presentaban cada vez con mas frecuencia en ocasiones en ráfagas y que finalmente se sumaban hasta presentarse súbitamente una actividad generalizada de descargas sincrónicas de gran amplitud y frecuencia en forma creciente y sostenida que duraban en promedio 48 segundos. Posterior a ello se observaban

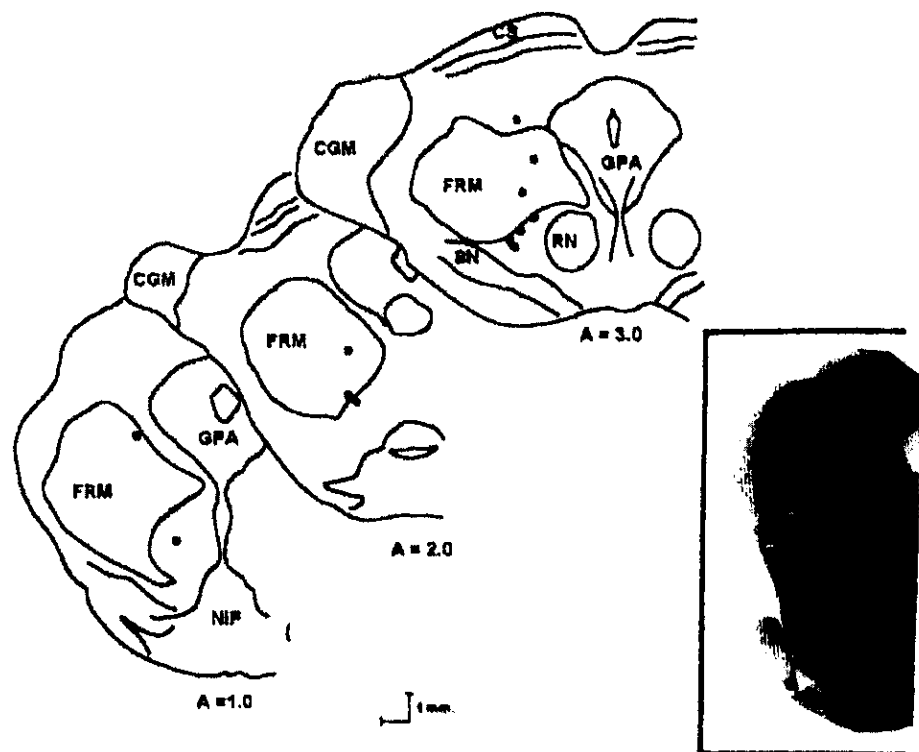
**nuevamente ráfagas de espigas de varios segundos de duración y actividad generalizada recurrente de gran amplitud que casi siempre estuvo acompañada de crisis convulsivas conductuales.**

**En promedio la latencia de aparición de la primera espiga EEG fue de 3.2 minutos y la latencia para la aparición de actividad hipersincrónica de gran amplitud y alta frecuencia en el EEG fue de 9.7 minutos.**

## **2.- Curva Dosis - Respuesta de Penicilina**

**Para determinar la relación entre la dosis administrada de penicilina y el efecto convulsivante se utilizó la solución isoosmolar de penicilina 212mM estandarizada a 150 mEq de sodio.**

**Esta solución fue aplicada en doce ocasiones dentro de las coordenadas específicas donde se había producido un efecto convulsivante en los experimentos con solución de penicilina 850 mM. Figura 14.**



**Figura 14.** Localización de los sitios de inyección de penicilina 212 mM. En el recuadro se observa la aplicación del colorante nitrato de plata. CGM (cuerpo geniculado medial), FRM (formación reticular mesencefálica), NIP (núcleo interpeduncular), GPA (gris periacueductal), NR (núcleo rojo), CS (colículo superior) y SN (sustancia negra).

El volumen inyectado en cada ocasión se iba incrementando de 0.1  $\mu$ L hasta que una crisis tónico clónica generalizada fuera registrada o un volumen total de 1.0  $\mu$ L fuera alcanzado. Los efectos eran esperados desde la primera inyección cada diez minutos, tomando en cuenta que de acuerdo a la dosis previa de penicilina 850 mM (500 UI /  $\mu$ L) los efectos aparecieron siempre antes de los diez minutos. En caso de no registrarse un evento convulsivo se agregaba una nueva inyección hasta alcanzar un volumen total de 1.0  $\mu$ L. Finalmente si no se presentaba una crisis tónico clónica generalizada en todos los casos se alcanzaban 125 UI de penicilina 212 mM en un volumen total de 1  $\mu$ L.

Esta solución fue aplicada en doce ocasiones en 11 diferentes animales y se pudo observar en todos los casos la presencia de algún tipo de crisis conductual y en diez ocasiones la presencia de un patrón EEG de espigas o un patrón de alta frecuencia y amplitud mayor de 50  $\mu$ V, como se observa en la tabla I.

TABLA I

Tipo de Crisis	No. De Eventos	UI penicilina	x	error estándar	p <
M. Facial	12	12.5 - 35.0	19.4	2	xxxxxx
M. Contralateral	10	25 - 50	38.5	7.8	0.05
M. Generalizada	10	25 - 100	54.2	9	0.003
Crisis Tónica	7	35 - 125	94.1	18.3	0.001
CTCG	6	62.5 - 125	117.5	14.8	0.001
<b>PATRON EEG</b>					
Espigas aisladas	9	12.5 - 87.5	33	8.2	xxxxxx
Ráfagas	10	25 - 87.5	57	8.8	0.04
Alta Frecuencia	8	25 - 125	91.7	17.5	0.005
A. Frecuencia y Ráfagas	5	87.5 - 125	108.1	15.6	0.001

El evento que siempre se presentó fue una crisis parcial mioclónica de la cara; a medida que se aumentaba la dosis inyectada los eventos conductuales o electroencefalográficos se iban presentando en la misma



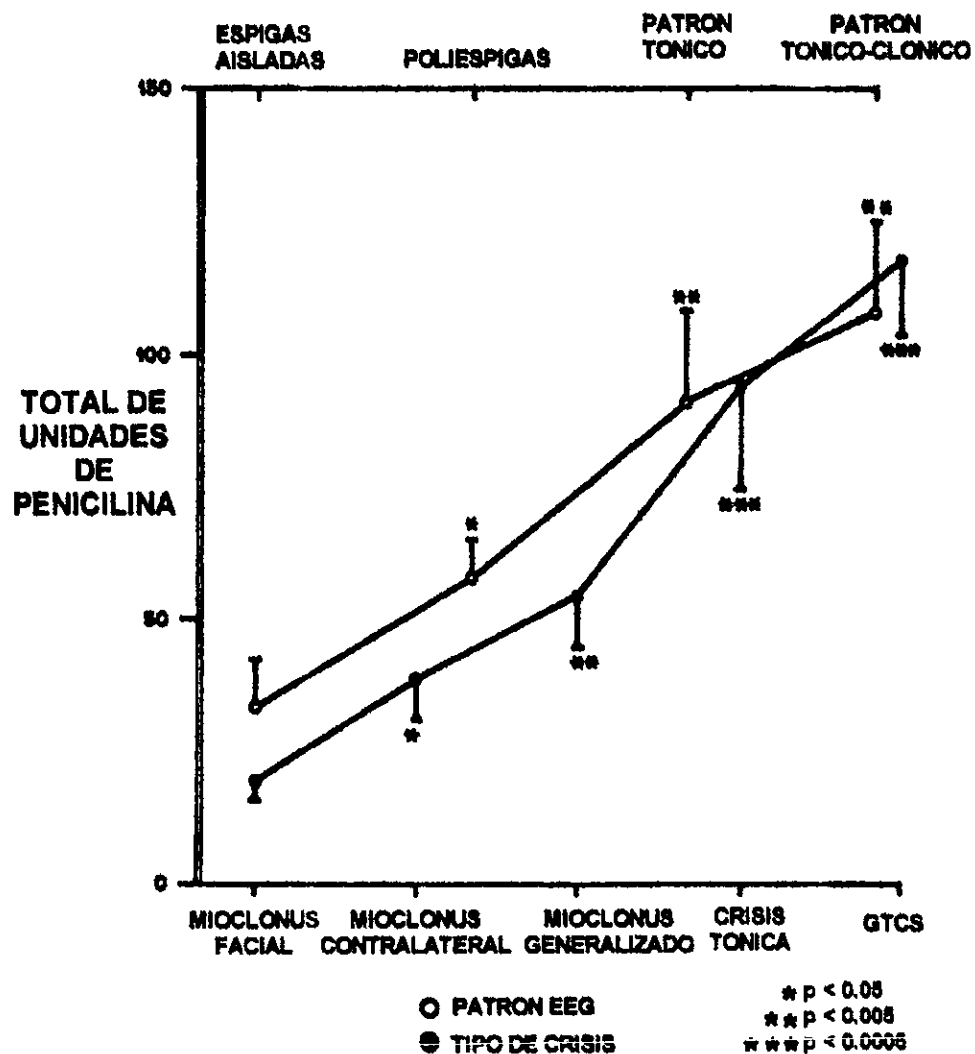
secuencia que se habían observado cuando se administró una solución de penicilina 850 mM (500 UI/ $\mu$ l), solo que con una progresión mucho más lenta. De tal forma que a las crisis parciales de cara siguieron las mioclonías del hemicuerpo contralateral al sitio inyectado, luego las mioclonías generalizadas y finalmente las crisis tónicas que culminaban en una crisis tónico clónica generalizada. Se determinó la media y los errores estándar de las dosis utilizadas que habían producido determinado tipo de crisis y los datos fueron sometidos a una prueba de Kruskal – Wallis.

Se encontró que existe una significancia estadística si se comparaban las dosis que inicialmente produjeron crisis faciales contra cada una de las dosis que habían producido los diferentes patrones de crisis. Como se observa en la Gráfica 2, existe una relación prácticamente lineal entre la dosis administrada y el tipo de crisis producida. Por otro lado, el efecto electroencefalográfico presentó también una relación lineal de la dosis administrada con el patrón de espigas aisladas, de poliespigas, de patrón de alta frecuencia y amplitud (patrón de tipo tónico) o de patrón de alta frecuencia y amplitud asociado a ráfagas de poliespigas (patrón de crisis tónico clónicas generalizadas), sin embargo, solo se observó un cambio estadísticamente significativo entre las dosis que produjeron patrón electroencefalográfico de espigas aisladas y poliespigas y las dosis que produjeron patrón electroencefalográfico de tipo tónico y tónico clónico.

Es importante señalar que los efectos conductuales se presentaron con una dosis promedio de penicilina menor que la dosis que produjo cambios en el EEG, en lo que a crisis parciales y espigas se refiere.

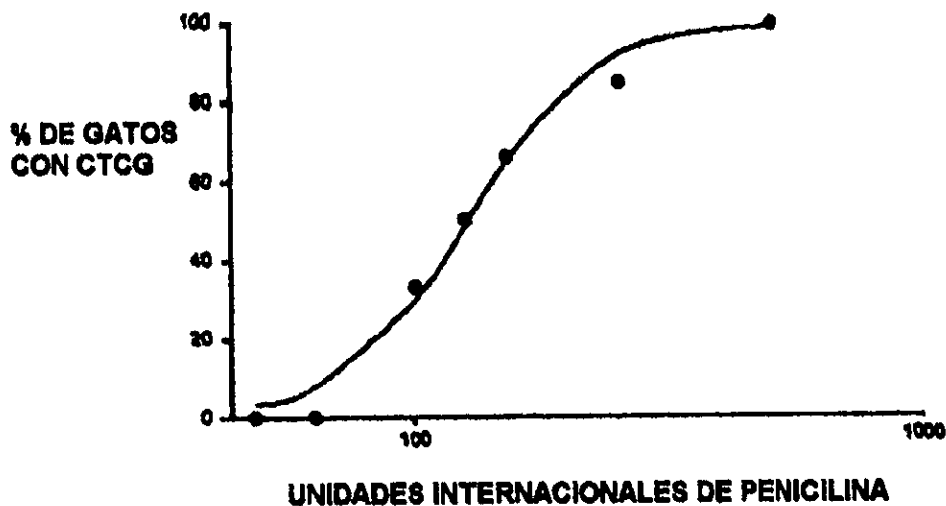
**Cuando las crisis tónicas y tónico clónicas aparecieron las dosis eran muy similares.**

**Posteriormente los datos del total de dosis inyectadas con los dos tipos de soluciones (850 mM y 212 mM) fueron sometidos a un programa de análisis logarítmico utilizando un programa estadístico Sigma Plot para así obtener la curva dosis respuesta logarítmica. La Gráfica 3 muestra el porcentaje del total de animales inyectados en relación con las dosis que produjeron crisis tónico clónicas generalizadas.**



Gráfica 2. La gráfica muestra la relación entre la aparición de eventos conductuales y EEG en relación a la dosis de penicilina 212mM administrada. Los cambios estadísticamente significativos fueron evaluados utilizando una prueba de Kruskal-Wallis.

### CURVA DOSIS- RESPUESTA PARA CRISIS TONICO CLONICAS GENERALIZADAS



*Gráfica 3. Aplicando los datos obtenidos por la inyección de penicilina a una escala logarítmica utilizando el programa Sigma Plot, se obtiene una distribución sigmoidea de la curva dosis - respuesta. La dosis convulsivante media de penicilina es de 121 UI.*

### 3.- Análisis de Actividad Multiunitaria por la Aplicación de Penicilina.

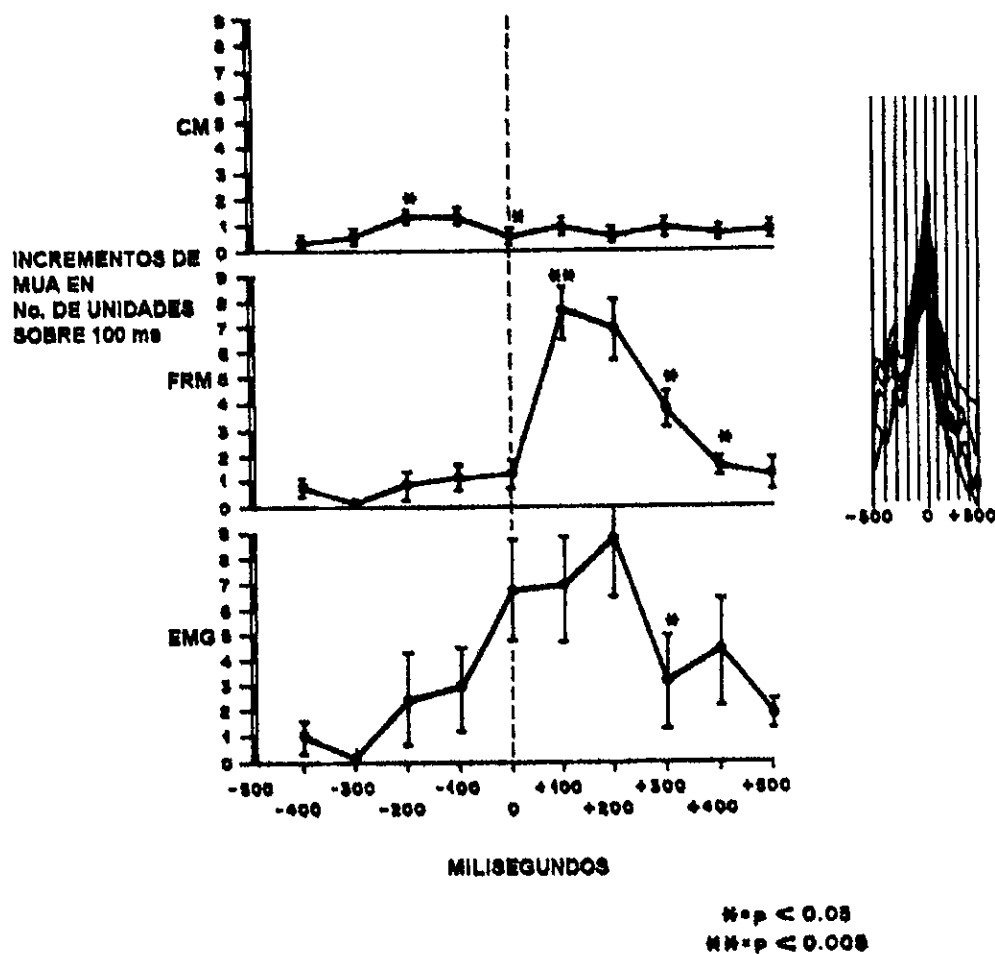
Tomando como tiempo cero la cima de diez espigas del EEG producidas por la aplicación de PSC 212mM, se promediaron los incrementos o decrementos obtenidos en la AMU registrada en la corteza sigmoidea ipsilateral al sitio de inyección, de la AMU adyacente al sitio de inyección y de los cambios en la AMU de los músculos del cuello. Se midieron los incrementos o los decrementos de cada periodo de 100 ms desde 500 ms antes hasta 500 ms después de la cima. Los efectos sobre

la AMU eran comparados en forma de integración en escalera, de tal forma que cada 100 ms se medía el número de unidades incrementadas o decrementadas sobre la AMU anterior (Gráfica 4).

En la corteza sigmodea ipsilateral los resultados muestran un cambio estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) de - 400 a -300 ms. Sin embargo, para el lapso entre - 100 ms a tiempo 0 se observó un decremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la misma corteza. Posteriormente no se observaron variaciones en la AMU cortical.

La AMU mesencefálica mostró un incremento importante de 0 a + 100 ms con una  $p < 0.005$ , que fue seguido por un decremento significativo de +200 a +300 ms y de +300 a +400 ms.

En la AMU de los músculos del cuello se observó un incremento constante desde los - 300 ms hasta los +200 ms sin presentar una significancia estadística. Después se observó un decremento estadísticamente significativo de +200 a +300 ms.



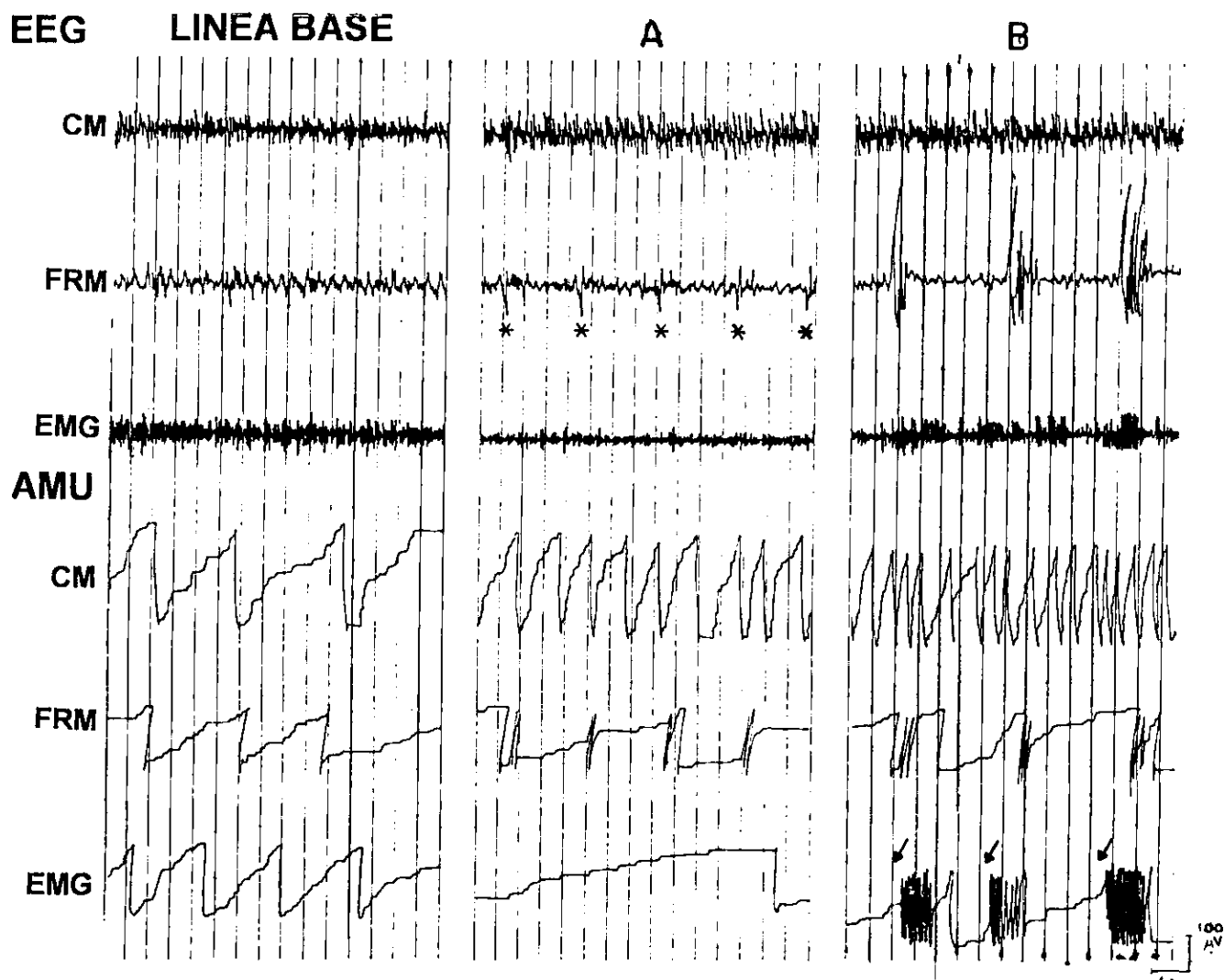
Gráfica 4. En una correlación temporal de la AMU de la corteza sigmoidea ipsilateral con la AMU de la FRM y con la AMU de los músculos del cuello se observa el promedio de los incrementos de AMU ocurridos cada 100 ms desde 500 ms antes hasta 500 ms después del tiempo cero. Para el análisis se consideró como tiempo cero el acmé de 10 espigas del EEG producidas por la aplicación de penicilina 212 mM. Los cambios fueron evaluados utilizando una prueba t de student (CM es corteza motora, FRM es formación reticular mesencefálica, EMG es electromiograma)

**4.- Correlación temporal de la actividad de campo y de la AMU entre la corteza cerebral, formación reticular mesencefálica y músculos del cuello**

**Se registró la secuencia de eventos electroencefalográficos y de AMU producidos por la aplicación de 12.5 UI de penicilina 212 mM y diez minutos después otras 12.5 UI de penicilina.**

**Para este análisis se tomó en cuenta la presencia de espigas en la actividad de campo o el incremento de la AMU en la corteza sigmoidea ipsilateral a la inyección, en la formación reticular mesencefálica adyacente a la inyección y en los músculos del cuello. Tres minutos después de la aplicación de la penicilina aparecieron espigas de aproximadamente 250  $\mu$ s de duración y de 100  $\mu$ v de amplitud en el área tegmental mesencefálica. Casi al mismo tiempo se observó un incremento de la AMU de la formación reticular mesencefálica en forma fásica, un incremento tónico de la AMU cortical sin cambio en el EEG cortical y un decremento de la amplitud del registro electromiográfico de campo y de su AMU. Cinco minutos después de la segunda inyección se observó una transformación de las espigas registradas en el tallo cerebral a un registro de ráfagas. En esta ocasión se observó un incremento tónico de la actividad de campo cortical, de la actividad fásica reticular y hasta este momento apareció un incremento de la actividad muscular en el EMG y en el registro de la AMU que correlacionó con mioclonias faciales.**

**En los primeros minutos la espiga reticular y el incremento de la AMU reticular parecían estar sincronizados pero al final del registro, se observó una disociación entre la espiga reticular, la AMU reticular y la AMU muscular.**



**Figura 15.** Se observan los efectos diferenciales de registro de campo (EEG) y los registros de AMU entre la corteza motora (CM), y la formación reticular mesencefálica (FRM) y la actividad muscular (EMG) en el período basal (LINEA BASE), al inicio de la primera actividad de campo (A) y al inicio de la primera actividad conductual (B).

Aun antes de la aparición de actividad paroxística cortical o muscular el tegmento mesencefálico inicia sincrónicamente disparos de campo (asteriscos) y AMU, después se suma la actividad muscular mientras que solo se observa un incremento generalizado de la AMU cortical sin la presencia de espigas EEG. Se puede apreciar la anticipación de la actividad de campo y de la AMU reticular al inicio de la crisis conductual (flechas).



En el EEG cortical no se observaron cambios durante todo el registro y en la AMU cortical solo hubo un registro que denotó un incremento tónico.

#### 5.- Determinación de los efectos de bicuculina en animales previamente tratados con penicilina

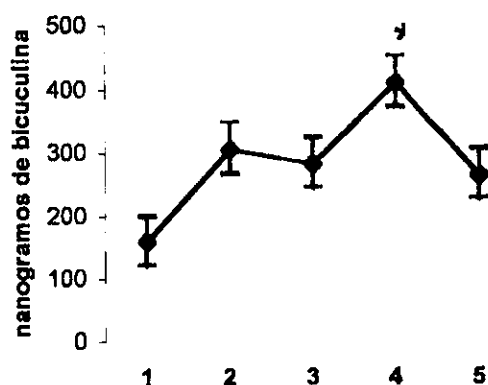
Para el estudio del efecto de la bicuculina se utilizó una concentración de 377 $\mu$ M en una dosis de 500 ng/1 $\mu$ L que fue diluida siempre en solución salina isotónica (Tsutsui 1992). Se analizaron diferentes soluciones de bicuculina que no variaron importantemente en la osmolaridad o el pH y que fueron en promedio de 215 mOsm/L y con un pH de 6.8, esta solución fue aplicada en el lado izquierdo de ocho de los once animales tratados con penicilina 212 mM con objeto de estudiar el efecto sobre un modelo con las mismas variables biológicas. En estos gatos después de la aplicación de penicilina, el animal convalecía de 3 a 5 días y era nuevamente colocado en el sistema de fijación estereotáctico por barras.

Se utilizaron desde 25 ng de bicuculina en 0.05  $\mu$ L de volumen hasta 500ng en 1.0  $\mu$ L. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla II.

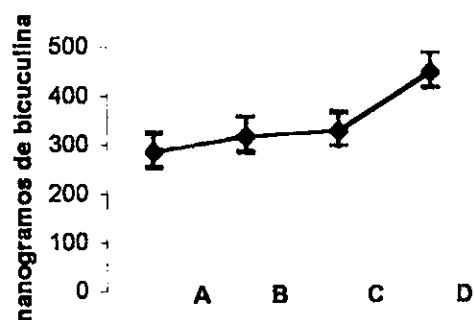
**TABLA II**

Tipo de Crisis	No. De Eventos	ng de bicuculina	x	error estándar	p <
M. Facial	4	25 - 250	162.5	54.5	xxxxxx0
M. Contralateral	6	25 - 500	308.3	88.7	0.383
M. Generalizada	5	50 - 500	285	74.8	0.201
Crisis Tónica	4	250 - 500	412.5	59.1	0.037
CTCG	3	50 - 500	266.7	130.2	0.463
<b>PATRON EEG</b>					
Espigas aisladas	8	125 - 500	290.6	48.2	xxxxxx
Ráfagas	6	25 - 500	320.8	74.8	0.586
Alta Frecuencia	4	50 - 500	331.2	97.6	0.601
A. Frecuencia y Ráfagas	5	250 - 500	450	50	0.057

**Efecto conductual de bicuculina sobre un tratamiento previo con penicilina**



**Efecto EEG de bicuculina sobre un tratamiento previo de penicilina**



\* es  $p < 0.05$

Gráficas 5 y 6.

Se aprecia en la gráfica de la izquierda una secuencia de eventos convulsivos producidos por la aplicación de bicuculina  $377\mu\text{M}$  en el tegmento mesencefálico de 8 gatos tratados previamente con penicilina  $212\text{mM}$ , se observó una secuencia de crisis parciales a crisis generalizadas similar a la observada cuando se administró penicilina pero aplicando un análisis estadístico no paramétrico de Kruskal- Wallis. Hubo cambios estadísticamente significativos sólo entre los mioclonus faciales y las crisis tónicas. No hubo otros cambios significativos entre otros diferentes tipos de crisis (1 = mioclonus facial, 2 = mioclonus contralateral, 3 = mioclonus generalizado, 4 = crisis tónica generalizada y 5 = crisis tónico clónica generalizada).

En la gráfica de la derecha se observan los cambios en el EEG como una pendiente en la dosis requerida para producirlos, no obstante no se encontró cambio significativo (A = espigas aisladas, B = espigas, C = una actividad de alta frecuencia y D = un patrón electroencefalográfico de alta frecuencia seguido de ráfagas de espigas).

En todos los casos de este grupo de animales se obtuvieron crisis convulsivas de algún tipo (Gráfica 5), a diferencia de los efectos obtenidos por la aplicación de penicilina no se observó una secuencia específica de eventos; de tal forma que con una dosis de 50 ng de bicuculina se pudo obtener una crisis tónico clónica generalizada y por el contrario en algunos gatos con una dosis de 500 ng, sólo se presentaron crisis parciales como mioclonías faciales o hemicorporales.

Esta conducta errática de los efectos producidos por el agente convulsivante no muestra cambios significativos, sólo entre las mioclonías faciales y las crisis tónicas existieron diferencias significativas de  $p < 0.05$  y no permite elaborar una curva logarítmica. Es importante señalar que de 8 animales tratados con bicuculina bajo un tratamiento previo con penicilina sólo 3 presentaron crisis tónico clónicas generalizadas.

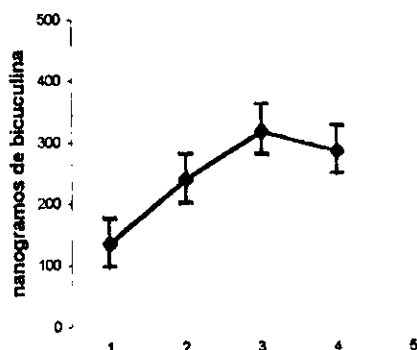
Las dosis de bicuculina que desarrollaron cambios como espigas, ráfagas o patrón electroencefalográfico de alta frecuencia, fueron siempre crecientes con una diferencia estadísticamente significativa sólo entre las espigas focales y las crisis tónico clónicas generalizadas.

#### 6.- Determinación del efecto de bicuculina en animales sin tratamiento previo con penicilina

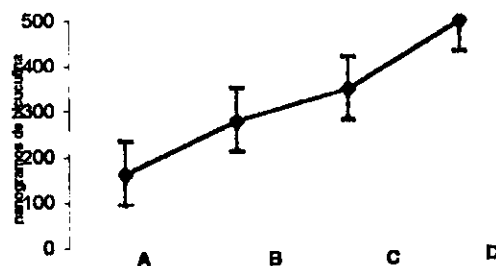
Se efectuó la determinación del efecto de la microinyección de bicuculina 377  $\mu\text{M}$  en un grupo de 6 animales que no habían recibido tratamiento previo con penicilina y en quienes se aplicó exactamente la misma concentración de bicuculina en el mismo volumen que para el grupo previo de animales. Los resultados se pueden observar en la Tabla III.

TABLA III					
Tipo de Crisis	No. De Eventos	ng de bicuculina	x	error estándar	p <
M. Facial	6	25 - 250	137.5	37.5	xxxxxxx
M. Contralateral	6	50 - 500	241.7	72.4	0.295
M. Generalizada	6	100 - 500	320.8	81.2	0.122
Crisis Tónica	6	50 - 500	287.5	81.1	0.195
CTCG	No se produjo CTCG en algun animal de este grupo				
PATRON EEG					
Espigas aisladas	5	100 - 250	165	26.9	xxxxxxx
Ráfagas	4	25 - 500	281.2	127.2	0.902
Alta Frecuencia	2	200 - 500	350	150	0.171
A. Frecuencia y Ráfagas	1	500	500	0	xxxxxxx

Efecto conductual exclusivo de bicuculina



Efecto EEG exclusivo de bicuculina



### Gráficas 7 y 8

En la gráfica de la izquierda se observan los efectos convulsivos producidos por la aplicación de dosis crecientes de bicuculina  $377 \mu\text{M}$  en gatos sin tratamiento previo de penicilina, el dato mas sobresaliente es que en ningún caso se obtuvieron crisis tónico clónicas generalizadas y no hubo cambios estadísticamente significativos entre las dosis requeridas para cada tipo de crisis. (1 = mioclonus facial, 2 = mioclonus contralateral, 3 = mioclonus generalizado, 4 = crisis tónica generalizada y 5 = crisis tónico clónica generalizada).

En la gráfica de la derecha se aprecia que todos los eventos buscados en el EEG fueron producidos con bicuculina pero las dosis requeridas para producir estos cambios no mostraron significancia estadística. (A = espigas aisladas, B = espigas, C = una actividad de alta frecuencia y D = un patrón electroencefalográfico de alta frecuencia seguido de ráfagas de espigas).

**En todos los casos en que se aplicó exclusivamente bicuculina se observó la presencia de crisis parciales mioclónicas o tónicas generalizadas, sin embargo, en ninguno de estos casos se pudo obtener crisis tónico clónicas generalizadas. La secuencia de aparición de los eventos convulsivos de todos los animales de este grupo fue muy similar a la secuencia observada en el grupo de animales en los que se aplicó penicilina. En cuanto a los eventos electroencefalográficos se pudieron obtener desde espigas aisladas hasta un patrón de alta frecuencia y ráfagas, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes dosis y sólo se obtuvo un patrón generalizado de alta frecuencia en un animal.**

#### **7.- Determinación del efecto sumado de penicilina isoosmolar y bicuculina**

**En tres gatos se inyectó una solución combinada de penicilina 212mM y de bicuculina 377 $\mu$ M de tal manera ajustada para administrar una dosis de 120 UI de penicilina y de 250 ng de bicuculina en un volumen de 1.5  $\mu$ L. En 2 de 3 experimentos se observó la secuencia de crisis mioclónicas, tónica y finalmente tónico clónica generalizada entre 11.5 minutos y 16 minutos con los correspondientes cambios electroencefalográficos desde espigas aisladas hasta ráfagas de espigas. En un caso se obtuvieron crisis tónicas generalizadas a los 12 minutos de la inyección con un patrón electroencefalográfico de ráfagas de espigas. En los tres casos se observó un incremento de la AMU de la FRM y en los dos casos que presentaron crisis tónico clónicas generalizadas no se observó un incremento de la AMU cortical.**

#### **8.- Determinación del efecto de penicilina o bicuculina más muscimol**

En tres gatos se aplicó una dosis de 500 UI de penicilina 850 mM más 100 ng de muscimol. 500 UI de penicilina fueron la dosis que produjo crisis generalizadas en nueve de diez ocasiones en que fue aplicada en la formación reticular mesencefálica en la primera fase de la tesis. Sin embargo en estos 3 experimentos se observó la aparición de mioclonías hemicorporales como máximo evento convulsivo acompañadas de espigas aisladas entre los 3 y los 26 minutos de registro. Se registró un ligero incremento de la AMU reticular y cortical (predominantemente reticular).

En tres animales diferentes se aplicó una dosis de 500 ng de bicuculina 377 $\mu$ M más 100 ng de muscimol y se obtuvieron entre el minuto y medio y los 15 minutos solo crisis mioclónicas hemifaciales acompañadas de espigas aisladas. La AMU reticular y cortical mostraron un muy ligero incremento.

#### **9.- Determinación del efecto de una solución de sodio hipertónico en la formación reticular mesencefálica.**

En un animal se aplicó en dos ocasiones (una a cada lado) un volumen de 1  $\mu$ L de una solución de cloruro de sodio a 480 mEq/L. Se efectuaron registros en ambas ocasiones durante 60 minutos sin obtener cambios conductuales o electroencefalográficos.

#### **10.- Análisis estadístico de los sitios inyectados**

Tanto en los sitios de aplicación de PSC 212 mM como en los sitios de aplicación de bicuculina sola o combinada, las coordenadas fueron medidas en milímetros y sometidas a dos pruebas estadísticas, una de

ellas fue la prueba paramétrica  $t$  de student y la otra fue la prueba F (Friedmann); no hubo cambios estadísticamente significativos en alguna de las coordenadas, tanto para los casos en los que se inyectó PSC 212 mM, como para los casos en los que se inyectó bicuculina. Estos resultados demuestran que el sitio elegido para la aplicación del agente convulsivante pudo ser alcanzado dentro de variaciones aceptables.

Por otro lado, al no haber diferencia significativa entre los efectos observados y el sitio de inyección (siempre que el sitio inyectado estuviera dentro de la FRM), se deduce que la dosis inyectada es el principal factor productor de los mismos.

## VII DISCUSION

De acuerdo a los datos obtenidos en este estudio la formación reticular del mesencéfalo tiene un papel importante en el origen de las crisis convulsivas tónico clónicas generalizadas. La penicilina sódica fue capaz de producir estas crisis convulsivas así como un patrón electroencefalográfico generalizado de alta frecuencia, cuando se aplicó en la FRM. Las discrepancias existentes con otros modelos similares que tratan de reproducir crisis generalizadas y que utilizan estimulación eléctrica o química fuera de la FRM, parecen depender de la magnitud del estímulo empleado o del efecto considerado como evento epiléptico.

Por ejemplo, es necesario aplicar aproximadamente 100 veces mas intensidad de corriente eléctrica en la corteza cerebral (50 a 150 mA según Porter 1981) para producir crisis convulsivas generalizadas, que la intensidad aplicada en el tallo cerebral de ratas, gatos o conejos para obtener el mismo resultado (0.1 a 2 mA según Kreindler 1958, Bergman 1963 y Burnham 1981).

Para un modelo experimental que utilice penicilina, la dosis administrada, la forma de administrarla y su concentración, han variado importantemente. Se han utilizado concentraciones desde 0.1  $\mu$  M (Eiselt 1998) hasta concentraciones 1700 mM (Ralston 1965). La primera fue administrada en corteza a razón de 50 UI de penicilina en forma tópica subdural sobre un hemisferio, los resultados estudiados para este modelo son flujos de corriente en un modelo de conejo anestesiado; en éste como en muchos modelos no se busca correlacionar el evento convulsivo. Para el modelo de Ralston, la penicilina fue administrada en volúmenes 4 a 15  $\mu$ L en un sitio específico desde el tálamo hasta la formación reticular mesencefálica, pontina y bulbar a una concentración



de 500 UI de penicilina por  $\mu\text{L}$  (una dosis total de 2000 a 7500 UI de penicilina). Estas dosis fueron correlacionadas con descargas corticales en gatos anestesiados sin observar el efecto conductual.

Desde este punto de vista el modelo aquí propuesto, trata de reproducir crisis conductuales y de resolver algunos problemas metodológicos como la concentración del agente convulsivante y los valores de osmolaridad, pH y concentración de sodio. Así, se correlacionó un sitio específico del tallo cerebral con la producción de crisis convulsivas conductuales y electroencefalográficas.

En conclusión el uso de una penicilina isoosmolar ajustada al pH y concentración de sodio fisiológicos, produjo crisis convulsivas generalizadas con un patrón constante. Permitió además discriminar un sitio crítico de la formación reticular del tallo cerebral como productor de crisis convulsivas generalizadas y determinó una relación directamente proporcional entre el efecto obtenido y la dosis administrada.

La posibilidad de que el efecto obtenido se deba a difusión de la penicilina es poco probable, porque el coeficiente de difusión de la penicilina obtenido por Goldenshon y Salazar en 1986 que es de  $0.72 \text{ mm}^2/\text{hr}$ , este coeficiente es incluso menor que el de  $1.5 \text{ mm}^2/\text{hr}$  obtenido por Noebels y Pedley en 1977. En ambos casos se utilizó penicilina marcada con C14 y aunque la diferencia podría explicarse según Goldenshon en función del método de registro, los efectos obtenidos en esta tesis se presentan dentro de los primeros 10 minutos. Esto permite asegurar que el efecto se debe a una acción local.

Además, las microinyecciones de las mismas dosis de penicilina en sitios a 2 mm de la zona crítica epileptógena no produjeron crisis.

Es poca la posibilidad de que otras estructuras cercanas a la FRM pudieran ser las productoras del efecto convulsivo, ya que las administraciones directas de penicilina en el pedúnculo cerebral, en la sustancia negra o en la formación reticular pontina (Figura 11) no produjeron crisis e incluso cuando se administró en la formación reticular pontina produjo somnolencia y un EEG de ondas lentas y con husos de sueño.

En esta tesis el área productora de crisis convulsivas esta restringida a la porción interna de la FRM y al tegmento mesencefálico.

El sitio epileptógeno crítico descrito en este estudio corresponde a los núcleos cuneiforme y subcuneiforme de la formación reticular mesencefálica que constituyen el centro de la misma y que están rodeados de un conjunto de vías ascendentes y descendentes de la formación reticular. Desde el nivel A4 (anterior 4) hasta el nivel A1 (de acuerdo a los atlas de Snider y de Verhaart) los sitios de inyección se encuentran ligeramente laterales o directamente sobre el fascículo *reticularis centralis*, que es un grupo de fibras ascendentes que se originan en la formación reticular mesencefálica y en planos más caudales como el nivel P4 (posterior 4). El fascículo *reticularis centralis* contiene también fibras del cerebelo ipsilateral, del núcleo principal del trigémino y de los núcleos vestibulares. El fascículo *reticularis centralis* continúa su trayectoria junto con el fascículo de Forel hasta terminar en la lámina medular interna del tálamo.

El fascículo de Forel es claramente visible en el mesencéfalo especialmente en el plano A5, donde se observa un grupo pequeño de fibras bien circunscritas, laterales a la sustancia gris periacueductal. Sin embargo, en el nivel A2 hasta A4 (justo sobre el sitio crítico epileptógeno

de este estudio) sus fibras se confunden con las fibras del fascículo *reticularis centralis* y ambos fascículos continúan su ascenso hasta el núcleo centro mediano del tálamo.

Otra estructura adyacente al área epileptógena crítica es el *fascículo tálamo – pretecto – tegmentalis* (o tracto de Bürgi y Bucher), éste es un fascículo descendente que se origina en el diencéfalo cerca del cuerpo habenular que termina en la formación reticular pontina a nivel P1 cerca del núcleo de Von Gudden y que parece también contener fibras del tegmento mesencefálico. Sin embargo, este fascículo se encuentra más alejado del área epileptógena que los fascículos *reticularis centralis* y de Forel.

Con relación al núcleo rojo y su fascículo rubro – espinal, éstos se encuentran mediales y rostrales a los sitios de inyección en los niveles A3 y A4. A medida que desciende el fascículo rubro - espinal en los niveles A1 a A3 se encuentra cercano a los sitios de inyección. De manera similar el *brachium conjunctivum* atraviesa el área tegmental mesencefálica justo antes de su llegada al núcleo rojo.

La formación reticular mesencefálica no tiene una vía directa de conexión anatómica con las motoneuronas espinales ni con las neuronas piramidales de la corteza cerebral. Sin embargo la activación de las neuronas de este sitio podría diseminarse por conducción a través de los fascículos *reticularis centralis* y de Forel hacia los núcleos de la línea media del tálamo (especialmente el núcleo centro-mediano).

Este sistema ya descrito como sistema talámico de proyección difusa (Dempsey y Morison 1942), diseminaría la actividad irritativa producida por la penicilina hacia la corteza cerebral a través del tálamo. En consecuencia, en un modelo de epilepsia como el presente se

**esperaría una actividad excitatoria progresiva desde el sitio de inyección hacia el tálamo y corteza motora ipsilateral para finalmente desencadenar una crisis generalizada una vez que la actividad irritativa hubiera involucrado ambos hemisferios.**

**En pacientes con epilepsia generalizada de difícil control, idiopática o debida a secuelas postencefalíticas, displasia cortical o esclerosis tuberosa la estimulación eléctrica crónica de alta frecuencia (120 Hz) de ambos núcleos centromedianos del tálamo, ha demostrado suprimir en un 85% el número total de crisis presentes antes del tratamiento (Velasco 1998 y Velasco 1993). Así mismo, ha demostrado un decremento significativo de la actividad paroxística en el EEG. Los resultados de esta tesis apoyan la teoría de un origen reticular en tallo cerebral de las crisis convulsivas generalizadas con una propagación vía núcleos intalaminares hacia la corteza cerebral.**

**Sin embargo, los resultados de esta tesis y de otros estudios (Velasco 1989) muestran que la actividad convulsiva muscular puede anticipar a la actividad paroxística cortical por varios segundos o incluso minutos. En los estudios de sección que separan a la FRM de las estructuras supramesencefálicas, la aplicación de pentilenetetrazol sistémico produjo crisis musculares sin producir actividad irritativa cortical (Velasco 1989).**

**Se plantea entonces la existencia de una vía de propagación retículo - espinal. El área de la formación reticular de tallo cerebral que se encuentra en el tegmento medial del puente y del bulbo y los núcleos localizados en el rafé pueden ser considerados eferentes descendentes de la formación reticular hacia las motoneuronas de la médula espinal, debido a que es en estas zonas es donde se originan la gran cantidad de**

proyecciones descendentes de la misma y que se han implicado en el control de las extremidades y del tono muscular del tronco (Van Der Kooy 1987).

Utilizando estudios electrofisiológicos, de autoradiografía o de trazadores, los núcleos *gigantocelular* rostral y *reticularis pontis caudalis pars beta* (ambos pertenecientes a la porción medial de la formación reticular bulbar y pontina) han sido identificados como las principales eferencias de la formación reticular sobre las motoneuronas torácicas y lumbares de los músculos paraespinales y de los músculos de la porción proximal de las extremidades. Incluso en algunos casos de los músculos distales ( Van Der Kooy 1987 y Newman 1995).

Para la producción de crisis convulsivas generalizadas por la aplicación de penicilina en la formación reticular mesencefálica sin la participación de la corteza cerebral, sería necesaria una vía de propagación descendente probablemente a los núcleos *reticularis pontis caudalis* o al núcleo *gigantocelularis*.

Los datos aportados por Browning y colaboradores demostraban la eliminación de crisis audiogénicas del tipo clónico II (correr y brincar) cuando se lesionaba el núcleo *reticularis pontis oralis*, adyacente al núcleo *reticularis pontis caudalis*. Recientemente Peterson (1996) ha demostrado que la aplicación de bicuculina en este sitio reproduce el clonus tipo II pero no modifica las crisis tónicas en extensión (componente fundamental de las crisis convulsivas generalizadas producidas por electrochoque máximo). Peterson (1996 y 1999) demuestra que la microinyección de agonistas GABA A y B en núcleo *reticularis pontis oralis* de ratas Wistar no modifican el patrón de crisis tónicas por electrochoque máximo; sin embargo, al administrar carbacol

200 mM pudo inhibir las crisis tónicas por electrochoque máximo. Peterson señala que el núcleo *reticularis pontis oralis* tiene un papel importante en la generación de crisis tónicas generalizadas y su acción podría estar regulada por un sistema colinérgico especialmente afín a receptores M2.

Para el caso particular de la penicilina el efecto conductual convulsivo, manifestado por la activación EMG y por la presencia de mioclonias focales, siempre anticipa la presencia de espigas focales en el EEG cortical, lo que hace suponer que una actividad de propagación descendente sobre las motoneuronas espinales, anticipa la activación de las neuronas corticales.

Como se muestra en la figura 15, el incremento en la AMU adyacente al sitio de inyección anticipa al incremento de la AMU cortical o muscular y se presenta antes de que las espigas aparezcan en la corteza cerebral. También se observa que la actividad de campo manifestada en el EEG de la formación reticular mesencefálica anticipan a la actividad EMG y EEG cortical. El incremento observado en la AMU cortical es un cambio tónico que no se acompaña de la presencia de espigas en el EEG cortical. Los cambios observados en la AMU y en la actividad de campo reticular son cambios fásicos (figura 15 A) que al inicio anticipan las descargas musculares y que posteriormente se disocian en tiempo (figura 15 B).

La FRM juega un papel importante como sitio crítico epileptógeno y apoya la teoría centroencefalista del origen de las crisis tónico clónicas generalizadas. Los cambios excitatorios locales provocados por un agente convulsivante como la penicilina favorecen el incremento de la actividad cortical o muscular de manera asincrónica.

**¿Por qué la FRM es un sitio especialmente sensible al efecto de los agentes convulsivantes?**

**Faingold y Caspary en 1987 demostraron que los estímulos sensoriales son capaces de iniciar crisis convulsivas generalizadas después de un tratamiento previo con dosis subumbrales de un agente convulsivante. Así mismo, el efecto más evidente de los agentes convulsivantes es el de aumentar la respuesta de las neuronas reticulares sensoriales y no sensoriales; estos datos orientan a considerar a la FRM como un gran centro coordinador y reclutador de información aferente hacia centros rostrales y caudales. El efecto masivo tanto ascendente como descendente de la gran mayoría de las neuronas reticulares podría resultar en un análogo de crisis. La capacidad de las drogas convulsivantes de realzar las respuestas sensoriales de las neuronas reticulares es común a los agentes que actúan afectando los sistemas gabaérgicos y colinérgicos (Faingold y Caspary 1987).**

**En esta tesis se demostró que la FRM es capaz de producir crisis generalizadas y crisis parciales mioclónicas.**

**Contrario al planteamiento de Browning, quién plantea que las mioclonias de cara y patas anteriores son producidas por irritación cortical, la administración tópica de penicilina en la FRM produjo crisis mioclónicas de este tipo. El hecho de haber obtenido crisis mioclónicas focales en cara y extremidades anteriores y su progresión a crisis regionales del hemicuerpo contralateral hace suponer de la existencia de una distribución somatotópica en la formación reticular. De otra forma la formación reticular tendría que reclutar otra estructura con una organización somatotópica bien conocida como lo es la corteza cerebral;**

sin embargo, es común la producción de crisis focales por excitación de áreas corticales más que de estructuras subcorticales y los datos obtenidos en este trabajo parecen establecer una disyuntiva en este sentido. Snodgrass en 1990 hizo una extensa revisión de las características clínicas de la actividad mioclónica y de los sitios implicados en el origen de esta actividad y señalaba un tipo de mioclonia sensible a estímulos del medio externo tradicionalmente asociados a estructuras corticales y correlacionados con actividad EEG y con potenciales evocados somatosensoriales anormalmente amplios. En su mismo trabajo, Snodgrass señala la existencia de un *mioclonus* reticular reflejo en pacientes con lesión cortical extensa, en quienes se presentan mioclonias generalizadas con potenciales evocados normales.

Entonces, ¿de qué forma la aplicación de penicilina en la FRM puede producir crisis focales similares a las obtenidas por kindling amigdalino?

El patrón descrito en este trabajo no parece involucrar una estructura cortical, en este sentido la administración en la FRM de dosis de penicilina subumbrales para la producción de crisis generalizadas puede tener un efecto activador sobre una estructura capaz de producir crisis parciales o de otra forma la FRM es la responsable de este efecto.

En 1990 Miller y Ferrendelli determinaron el efecto de agonistas GABA A (ácido piperidín 4 sulfónico, flunitracepam y pentobarbital) y de un agonista GABA B (baclofén) sobre en núcleo centro mediano del tálamo en un modelo de crisis mioclónicas, clónicas y tónicas inducido en la rata por la administración sistémica de pentilinetetrazol. Se observó que tanto los agonistas GABA A como B disminuían el umbral del pentilinetetrazol para producir crisis mioclónicas y clónicas. En cambio,



el umbral para las crisis tónicas solo era disminuido por el baclofén. Ambos tipos de fármacos disminuían la AMU local así como la actividad EEG y deprimían la actividad motora. Contrariamente la bicuculina produjo un incremento de la AMU local, también produjo una hiperactividad motora pero no produjo cambios EEG. Cuando la bicuculina se aplicaba en el núcleo centromediano facilitaba las crisis tónicas si se administraba pentilenetetrazol sistémico. Así Miller y Ferrendelli determinaron que el núcleo centromediano del tálamo contribuye en forma diferencial a la propagación de las crisis que se originan por un agente sistémica. La inhibición local del núcleo centromediano por agonistas GABA A produce facilitación de las crisis mioclónicas o clónicas en cambio previene la producción de crisis generalizas. La excitación de este mismo núcleo por bicuculina favorece la presencia de crisis tónicas.

En 1992, Hirayasu y Wada produjeron crisis tónicas y clónicas generalizadas cuando administraban NMDA en los núcleos de la línea media del tálamo. Estas convulsiones estuvieron asociadas con descargas del lóbulo temporal, específicamente cuando se administró el NMDA en el núcleo *Reuniens*. Se ha comprobado que el núcleo *Reuniens* envía sus fibras como un denso plexo a la capa lacunar y molecular de la porción CA1 del hipocampo, estas fibras terminan en las dendritas apicales espinosas así como en dendritas no espinosas de interneuronas. La estimulación eléctrica del núcleo *Reuniens* origina diferentes respuestas electrofisiológicas en la porción CA1 del hipocampo, tanto de las neuronas piramidales como de las interneuronas y estos resultados orientan a pensar en una función de modulación de la actividad hipocámpica.

**Fernández –Guardiola en 1995 informó de la producción de crisis convulsivas generalizadas por la aplicación de penicilina en la amígdala de gatos adultos en libre movimiento. El patrón conductual que se observó comprende seis estadios ya descritos por Wada y Sato en 1974.**

**La aplicación de penicilina en dosis únicas de 170 a 425 mM en la amígdala produjo crisis convulsivas en cuatro de seis ocasiones con una latencia variable pero con la aparición de espigas locales dentro de los primeros 6 segundos. La propagación de la actividad de espigas a la corteza frontal ipsilateral fue a los 9 minutos, a la corteza frontal contralateral a los 12 minutos y a la amígdala contralateral a los 212 minutos. Cuando se aplicaron dosis repetidas de 250 UI de penicilina en 30 ocasiones se obtuvieron 86 crisis convulsivas con una latencia de aparición de 73 minutos. Estos resultados son similares a los obtenidos en esta tesis en cuanto al patrón de crisis obtenido, que tradicionalmente se ha considerado para crisis de origen telencefálico. Sin embargo, para este informe el tiempo de presentación de crisis tónico clónicas generalizadas (6 de 12 ocasiones) fue de 8.6 minutos utilizando una solución de penicilina de 212 mM que fue inyectada en la FRM y se pudo reproducir 29 crisis tónico clónicas generalizadas.**

**La aplicación de penicilina 212mM en la FRM produjo crisis parciales mioclónicas tipo I y tipo II (de acuerdo a Browning), que semejan a las obtenidas por kindling amigdalino (Fernández Guardiola1995) cuando se administra penicilina 170 a 425 mM en la amígdala. Una probable explicación de la presencia de crisis parciales al activar la FRM es la propagación de la actividad epiléptica de la FRM a los núcleos intralaminares y de la línea media y una posterior activación de la amígdala.**

**En este trabajo podemos afirmar que pueden existir crisis focales motoras antes que aparezca cualquier actividad en la corteza motora. Sería conveniente efectuar un registro específico en el que se registrara la actividad de campo y la AMU del complejo amigdalino utilizando el modelo aquí propuesto.**

**En cuanto al mecanismo de acción del agente convulsivante, la evidencia de una acción antigabaérgica de la penicilina fue reforzada por los datos obtenidos en este estudio, el uso de un agente antagonista específico de los receptores GABA A produjo efectos convulsivos y electroencefalográficos similares a los obtenidos por la penicilina. Sin embargo, existen diferencias sustanciales entre ambos agentes, como lo es el hecho de no haber obtenido una curva dosis - respuesta de bicuculina semejante a la de penicilina, la secuencia de presentación de eventos convulsivantes obtenidos por la bicuculina no tiene la misma relación entre la actividad conductual y electroencefalográfica. Particularmente con la aplicación de bicuculina se pueden presentar crisis generalizadas con dosis lo suficientemente bajas para producir crisis focales. En general la aplicación de bicuculina solo pudo reproducir crisis tónico clónicas generalizadas bajo tratamiento previo con penicilina ocasiones y solo en 3 de 8 ocasiones; nunca se pudieron obtener crisis tónico clónicas generalizadas con un tratamiento exclusivo de bicuculina.**

**La penicilina puede actuar mediante un estado inicial de hiperpolarización que se transforma paulatinamente en un cambio de despolarización reforzado por potenciales postsinápticos excitatorios y por bloqueo de los potenciales postsinápticos inhibitorios mediados por**

**GABA; mientras que la bicuculina actúa fundamentalmente sobre el receptor GABA-A acoplado a una subunidad del canal de cloro. En sentido estricto el mecanismo de acción es diferente aun a pesar de estar los dos influyendo sobre un sistema gabaérgico. Existe la posibilidad de que la penicilina posea otro efecto diferente sobre un sistema excitatorio que potencia su acción convulsivante.**

**Se han producido anticuerpos monoclonales contra el complejo receptor GABA A- benzodiazepinas que reconocen a la subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Estos anticuerpos han sido utilizados en estudios de inmunohistoquímica para localizar la presencia del receptor GABA A en el cerebro de ratas (de Blas 1988 y Richards 1987). Por esta técnica se encontró abundante inmunoreactividad en el telencéfalo, colículo inferior, formación reticular y cerebelo. Sin embargo, los avances recientes en biología molecular han determinado que el receptor GABA compuesto de por lo menos cinco subunidades y de diversas variantes,  $\alpha$  1-5,  $\beta$  1-3,  $\gamma$  1, 2 y  $\delta$ . De tal forma,**

**En 1990 Hironaka determinó la presencia de la subunidad  $\alpha$ 1 del receptor GABA A por hibridación *in situ* histoquímica de oligonucleótidos de mRNA marcados para la secuencia de esta subunidad a lo largo de todo el tallo cerebral de ratas Wistar. Se encontró un intenso marcaje, entre otras estructuras, en las neuronas grandes de la formación reticular y un marcaje moderado en las neuronas pequeñas. Específicamente en la FRM se encontró una combinación de ambos tipos de marcaje; con una mayor concentración hacia la porción del tegmento ventral del mesencéfalo. Se observó una gran concentración de estos oligonucleótidos marcados en la sustancia negra y en el núcleo rojo.**

En 1991 Sholomenko pudo inhibir la actividad motora de aves descerebradas provocada por la estimulación eléctrica de la formación reticular bulbar aplicando GABA en la FRM a una concentración de 0.5 M en 1  $\mu$ l. De acuerdo los trabajos de Hironaka y colaboradores (1990) los niveles más altos de GABA en el mesencéfalo fueron encontrados en la sustancia negra y en el núcleo rojo, no obstante como ya mencionó, el núcleo cuneiforme muestra presencia de receptores GABA A y es eficaz para bloquear la actividad motora en el modelo de Sholomenko al aplicar agonistas GABA. De acuerdo los resultados de esta tesis parecen confirmar que la acción de la penicilina es mediada, por lo menos en parte, por receptores GABA A, si la penicilina se aplica en la porción tegmental de la FRM, por tanto, la bicuculina produjo un efecto convulsivo y el muscimol previno el efecto convulsivo de la penicilina y del la bicuculina .

Al determinar los efectos diferenciales de la aplicación de bicuculina sola o bajo un tratamiento previo con penicilina se comprobó para cada grupo (animales con tratamiento previo de penicilina y animales con tratamiento exclusivo de bicuculina) que no existen diferencias estadísticamente significativas (prueba de Kruskal - Wallis) para ninguna de las dosis de bicuculina sobre el efecto conductual o electroencefalográfico.

**VIII BIBLIOGRAFIA**

**Ayala G.F., Spencer W.A. and Gurnmit R.J. Penicillin as an epileptogenic agent: Effect on an isolated synapse. Science. 1971; 171:915-917.**

**Ayala GF and Vasconsetto C. Penicillin is an epileptogenic agent: Its effect on an isolated neuron. Science. 1970; 60:1257-1260.**

**Bergmann F, Costin A, Gutman J. A low threshold convulsive area in the rabbit mesencephalon. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1963; 15:683-690.**

**Browning R, Effect of lesions on seizures in experimental animals. En Epilepsy and the reticular formation: The role of the reticular core in convulsive seizures. Ed:FromGH. et.al. 1987. Alan L.Riss. Inc. New York. pp:137-162.**

**Browning R, nelson D, Mogharreban N, Jobe P and Laird H. Effect of midbrain and pontine tegmental lesions of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. Epilepsia. 1985; 26:175-183.**

**Burnham W M and Browning R A. The "reticular core" and generalized convulsions. A unified hypothesis in epilepsy and the reticular formation. The role of the reticular core in convulsive seizures. Ed: Fromm GH, Faingold CL, Browning RA and Burham WM. Alan R. Liss. New York. 1987; pp:193-201.**

**Burnham W, Core mechanisms in generalized convulsions. Fed Proc. 1985; 44:2442-2445.**

**Chatt A.B. and Ebersole J.S. Comparisons between strychnine and penicillin epileptogenesis suggest that propagating epileptiform abnormalities require the potentiation of thalamocortical circuitry in neocortical layer 4. Experimental Neurology. 1988; 100:365-380.**

**de Blas A.L., Victorica J. And Friedrich P. Localization of GABA receptor in the rat brain with monoclonal antibody to the 57 000 M peptide of the GABA A receptor / benzodiazepine receptor /CL- channel complex. J. Neurosc. 1988; 8:602-614.**

**De Lorey TM and Olsen RW. GABA and Glycine. In Basic Neurochemistry. De: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW and Molinoff PB. Raven Press. New York 1994. pp: 389-400.**

**Dempsey E W, Morison R S. The production of rhythmically recurrent cortical potentials after localized thalamic stimulation. Amer J Physiol. 1942; 135:293-300.**

**Eiselt M., Zweiner U., Wagner H. And Schindler T. Intracortical functional heterogeneity in area striate during penicillin-induced spikes in rabbits. Epilepsy Research. 1998; 30:177-186.**

**Faingold C. and Caspary D M. Effect of convulsant drugs on the brain stem. In Epilepsy and the reticular formation: The role of the reticular core in convulsive seizures. Ed: Fromm GH, Faingold CL, Browning RA and Burnham WM. Alan R. Liss. New York 1987; p: 39-80.**

**Feinstein B., Gleason C.A. and Libet B. Stimulation of locus coeruleus in man . Preliminary trials for spasticity and epilepsy. Stereotac. Funct. Neurosurg. 1989; 52:26-41.**

**Fernández-Guardiola A., Martínez A. And Fernández-Mas R. Repeated penicillin induced amygdala epileptic focus in free moving cats. EEG, polysomnographic (23-h recording) and brain mapping study . Epilepsy Res. 1995; 22:127-136.**

**Fisher R S. Animal models of the epilepsies. Brain Research Reviews. 1989; 14:245-278.**

**Gale K and Browning R A. Anatomical and neurochemical substrates of clonic and tonic seizures. In Mechanisms of epileptogenesis. The transition to seizure. Ed: Marc A. Dichter . Plenum Press. New York. 1988. pp:111-152.**

**Garant D and Gale K. Lesions of substantia nigra protect against experimentally-induced seizures. Brain Res. 1983; 273:156-161.**

**Gloor P, Quesney LF and Zumstein H. Pathophysiology of generalized penicillin epilepsy in the cat: role of cortical and subcortical structures. II**



**Topical application of penicillin to the cerebral cortex and to subcortical structures. *Electroenceph Clin Neurophysiol.* 1977; 43:79-91.**

**Goldensohn E. and S, Salazar A. Temporal and spatial distribution of intracellular potentials during generation and spread of epileptogenic discharges. *Advances in neurology, Vol.44.* Ed Delgado-Escueta AV, Ward Jr. AA, Woodbury DM and Porter RJ. Raven Press. New York 1986.**

**Hironaka T., Morita Y., Hagihira S., Tateno E., Kita H. And Tohyama M. Localization of GABA-A receptor alpha 1 subunit mRNA- containing neurons in the lower brainstem of the rat. *Molecular Brain Research.* 1990; 7:335-345.**

**Hoechner B., Spira M.E. and Werman R. Penicillin decreases chloride conductance in crustacean muscle: A model for the epileptic neuron. *Brain Research.* 1976; 107:85-103.**

**Indianola M and Gale K. Substantia nigra: Site of anticonvulsant activity mediated by gamma-amino butyric acid. *Science.* 1982; 218:1237-12140.**

**Jasper H H. Mechanisms of propagation: Extracellular studies. In *basic mechanisms of the Epilepsies.* Ed: Jasper HH, Ward AA Jr and Pope A. Little and Brown, Boston 1969; p: 421-440.**

**Jinnai D, Mogami H, Mukawa J, Iwata Y and Kobayashi K. Effect of brain stem lesions on metrazol-induced seizures in cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1969; 27:404-411.**

**Kreindler A, Zuckermann E, Steriade M, Chimion J. Electroclinical features of convulsions induced by stimulation of the brain stem. J Neurophysiol. 1958; 21:430-436.**

**McCandless D.W. and Finesmith R.B. Chemically Induced Models of Seizures. In Animals Models of Neurological Disease. II Metabolic Encephalopathies and the Epilepsies. Ed:Boulton A., Baker G.B and Butternorth R.F. New Jersey 1992 pp:133-182.**

**McDonald R L and Barker JL. Pentilene-tetrazol and penicillin are selective antagonists of GABA – mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurons. Nature. 1977;267:720-721.**

**Mc Namara J D, Galloway M T, Regisbes L C, Shin C. Evidence implicating substantia nigra in regulation of kindled seizures threshold. J Neurosci. 1984; 4:2410-2417.**

**Meldrum B. Epileptic Seizures. In Basic Neurochemistry. Ed: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW and Molinoff PB. Raven Press. New York 1994. pp:885-897.**

**Moruzzi G, Magoun H W. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1949; 1:455-473.**

**Newman D B. Anatomy and neurotransmitters of brainstem motor systems. In Negative Motor Phenomena. Ed: S. Fahn, M. Hallet, H.O.**

**Lüders and C.D. Marsden. Advances in Neurology. Vol. 67. Lippincott – Raven Publishers. Philadelphia 1995, pages:219-244.**

**Noebels JL and Pedley TA. Anatomic localization of topically applied <sup>14</sup>C penicillin during experimental focal epilepsy in cat neocortex. Brain Res. 1977; 125:293 - 303.**

**Olsen R W. The GABA postsynaptic membrane receptor -ionophore complex. Site of action of convulsant and anticonvulsant drugs. Mol Cell Biochem. 1981; 39:261-279.**

**Penfield W, JasperH.H. Epilepsy and Functional Anatomy of the Human Brain. Little Brown.Boston . 1954, P:713.**

**Peterson S.L. The effect on maximal electroshock seizures induced by GABA agents and antiepileptic drugs microinfused into the nucleus reticularis pontis oralis. Epilepsy Research. 1996;25:161-167.**

**Peterson S.L. and Armstrong J.J. Muscarinic receptors mediate carbachol induced inhibition of maximal electroshock seizures in the nucleus reticularis pontis oralis. Epilepsia. 1999; 40:20-25.**

**Pockberger H., RappelsbergerP. And Pesche H. Penicillin induced phenomena in the rabbit's neocortex II. Laminar specific generation of interictal spikes after the application of penicillin to different cortical depths. Brain Research. 1984; 309:261-269.**

**Pollen DA. Experimental spike and wave responses and petit mal epilepsy. *Epilepsia* 1968; 9:221-232.**

**Porter R J, Cereghino J J, Gladding GD, Hessie BJ, Kupferberg HJ, Scoville B and White BG. Antiepileptic drug development program. *Cleve Clin Q.* 1981; 51:293-305.**

**Prince D.A. and Wilder B.J. Control mechanisms in cortical epileptogenic foci. *Arch. Neurol.* 1967;16:194-202.**

**Prince DA. The depolarization shift in epileptic neurons. *Exp Neurol.* 1968; 21:467-485.**

**Ralston BL and Langer H. Experimental epilepsy of brain-stem origin. *Electroenceph Clin Neurophysiol.* 1965; 18:325-333.**

**Richard J.G., Schoch P., Haring P., Takacs B. And Möhler H. Resolving GABA A / benzodiazepine receptors: Cellular and subcellular localization in the CNS with monoclonal antibodies. *J. Neurosc.* 1987; 7:1866-1886.**

**Schelbel ME, Schelbel AB. Structural substrates for integrative patterns in the brain stem reticular core. In *Reticular formation of the brain.* Ed: Jasper HH, Proctor LD, Knighton RS, Noshay WC, Costello RT. Little and Brown Boston 1958; p:31-53.**

**Sholomenko G.N., Funk G.D. and Steeves J. D. Avian locomotion activated by brainstem infusion of neurotransmitter agonists and antagonists. II.  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Exp Brain Res.* 1991; 85:674-881.**

**Snider R S, Niemer W T. A stereotaxic atlas of the cat brain . The University of Chicago Press . Chicago 1964.**

**Snodgrass S.R. Myoclonus : Analysis of monoamine , GABA and other systems. *FASEBJ.* 1990;4:2775-2788.**

**Swinyard E. Electrically induced convulsions. In: *Experimental models of epilepsy.* Ed: Purpura D, Penry J, Tower D, Woodbury D and Walters R. Raven Press. New York. 1972. pp:433-458.**

**Tsutsui J, Terra VC, Oliveira JA and García Cairasco N. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus. I. Effects of midcollicular knife cuts. *Behav Brain Res.* 1992; 52(1):7-17.**

**Tuttle W W and Elliott H W. Electrographic and behavioral study of convulsivants in cats. *Anesthesiology.* 1969;30:46-64**

**Van Der Kooy D. The reticular core of the brain – stem and its descending pathways: Anatomy and function. In *Epilepsy and reticular formation: The role of the reticular core in convulsive seizures,* Ed: GH. Fromm, C.L. Faingold, R.A. Browning and W.M.Burham. Alan R. Liss, Inc. New York 1987;pages:9-23.**

**Vehaart WJC. A stereotactic atlas of the brain stem of the cat. Davis Co. Philadelphia 1987; pages:10-39.**

**Velasco F and Velasco M. Mesencephalic structures and tonic-clonic generalized seizures. In Generalized Epilepsy. Ed: Avoli M. Berkhaüsen, Boston 1989. pp: 285-322.**

**Velasco F., Velasco M. and Romo R. Specific and nonspecific activities during pentylenetetrazol seizures in animals with pretrigeminal brain stem transection. Experimental Neurology . 1981;74:1-10.**

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

**Velasco F, Velasco M, Pacheco T and Márquez I . Comparative effects of topical perfusions of pentylenetetrazol in the mesencephalon and cerebral cortex of cats. Exp Neurol. 1985; 87:533-544.**

**Velasco F., Velasco M., Velasco AL. and Jiménez F. Effect of chronic electrical stimulation of the centromedian thalamic nuclei on various intractable seizure patterns: I. Clinical seizures and paroxysmal EEG activity. Epilepsia. 1993; 34:1052-1064.**

**Velasco F., Velasco M., Jiménez F., Velasco AL., Brito F. And Rise M. The role of thalamic electrical stimulation in the control of seizures. In**

**Textbook of stereotactic and functional neurosurgery. Eds: Gildenberg Ph. And Tasker R. Mc Graw –Hill. New York 1998. pp: 1933-1940.**

**Wada J.A. and Sato M. Generalized convulsive seizures induced by dally electrical stimulation of amygdala in cats. Correlative electrographic and behavioral features. Neurology. 1974; 24:555-574.**

**Wada J and Sato M. Effects of unilateral lesion in the midbrain reticular formation on kindled amygdaloid convulsions in cats. Epilepsia. 1975; 16:693-697.**

**Walker A E and Johnson H C. Convulsive factor in commercial penicillin. Arch Surg. 1945; 50:69-73.**

**Weir B. Spike – wave from stimulation of the reticular core. Trans Am Neurol Assoc. 1964; 89:269-270.**

**Wong R K S and Prince D A. Dendritic mechanisms underlying penicillin induced epileptiform activity. Science. 1979;204:1228-1231.**



## Seizures induced by penicillin microinjections in the mesencephalic tegmentum

Fiacro Jimenez, Francisco Velasco \*, Jose Carrillo-Ruiz,  
Francisco Estrada Villanueva, Marcos Velasco, Hector Ponce

*Units of Neurology and Neurosurgery, General Hospital and Children's Hospital SS and Medical Research Department,  
National Medical Center IMSS, Mexico, Mexico*

Received 30 March 1999; received in revised form 14 June 1999; accepted 18 June 1999

### Abstract

The location and extension of a convulsive area in the brain stem in cats was determined through penicillin microinjections (0.5–1.0  $\mu$ l) of a concentrated sodium penicillin solution (500 IU/ $\mu$ l), stereotactically oriented to multiple structures, in fully awake animals, partially restrained through a rod fixation system that avoided pain, allowed the observation of clinical seizures and simultaneous recording of EEG, EMG and multiple unit activity (MUA) from the injected site and the motor cortex (Cx). Clinical and EEG seizure patterns in relation to the injected sites and penicillin doses were studied in another group of animals using doses from 12.5 IU/0.1  $\mu$ l to 125 IU/1.0  $\mu$ l. The time relationship between muscular clonus, EEG spikes and MUA at the injected site and Cx were analyzed. The only area in which penicillin induced seizures was the mesencephalic tegmentum (MT). The amount of penicillin but not the stereotactic coordinates determined the seizure type. MT EEG and MUA paroxysms anticipated clinical seizure and Cx EEG spikes. When Cx EEG appeared, they were accompanied by an increase in MUA beginning in the Cx and EMG, followed by significant increase in MT MUA. The sequence of events suggest that MT seizure activity propagates via alternative pathways not involving direct reticulospinal or pyramidal tract pathways. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Brain stem; EEG; Multiple unit recording; Penicillin; Reticular formation; Seizure pattern

### 1. Introduction

Experimental data has provided evidence of the participation of the brain stem in the genesis and propagation of convulsive activity (for review, see

Fromm et al., 1987; Gale and Browning, 1988; Velasco and Velasco, 1990).

From those observations a number of controversies have been raised in regard to: (1) the anatomical structures involved in the genesis of seizures; (2) the clinical type of seizures induced in the brain stem; and (3) the possible mechanisms by which epileptic activity 'originated' in the brain stem propagates to the forebrain, spinal cord and muscles.

\* Corresponding author. Tel.: + 52-5-5784238; fax + 52-5-6060393.



Discrepancies are probably related to the methods used to induce seizure, as many observations were made using systemic convulsants (PTZ, penicillin, bicuculline, maximal electroshock seizure or MES, etc.) or by topical applications designed so that the convulsant may reach several structures simultaneously (pledgets, push pull perfusion, powder, large volume of solution, etc.), rendering the correlation of the anatomical site with the effect obtained practically impossible. On the other hand, many observations have been made in anesthetized or paralyzed preparation allowing EEG and unitary or multiunit activity (MUA) recordings but certainly interfering in the correlation of such recordings with clinical events. Finally, many of the convulsant methods have a poorly defined action mechanism (electrical stimulation, MES, cobalt, aluminum hydroxide, etc.) or have been used in amounts and concentrations that cast doubts on their possible diffusion and the participation of other physiological variables (pH, osmolarity, electrolytic content, etc.) in the epileptic event studied.

Sodium penicillin (NaPC) is a convulsant with well defined intracellular (Ayala and Vasconsetto, 1970; Wong and Prince, 1979), topical (Pockberger et al., 1984; Chatt and Ebersole, 1988) and propagated (Crowell, 1970; Gloor et al., 1977; Horn and Gehring, 1996; Redecker et al., 1997) mechanism, and maybe prepared in stable, buffered solutions approaching interstitial fluid constants.

The present study describes the effects of NaPC injected in small volumes of a solution resembling the interstitial fluid in pH, osmolarity and sodium content within the brain stem of awake cats, partially restrained to allow EEG and MUA recordings during seizures and at the same time the observation of the clinical events elicited. Special attention was paid to the identification of the injected sites.

## 2. Material and methods

Twenty-five adult cats weighting 2.8 to 3.6 kg were used for the experiments. All had an initial surgery under general anesthesia with intraperi-

toneal sodium penthotal (20 mg/kg) for implanting a stereotactically oriented 16-gauge cannula guide, 0.5 cm short of the intended target to inject penicillin solution into the brain stem, as well as a 45° angled cannula convergent to the previous target to allow the passage of a microelectrode for recording EEG and multiple unit activity (MUA) of the injected area. Burr holes were performed to allow placement of silver balls for EEG recordings from right and left suprasylvian cortices (RSS and LSS) and left anterior sigmoid gyrus (LAS) and a craniotomy window over the right anterior sigmoid (RAS) gyrus to allow passage of a microelectrode for MUA and EEG recordings of the subjacent cortex (Cx) was also performed. Stainless steel wires isolated but 3 mm from their tips were inserted in the posterior neck muscles on both sides to record EMG. A screw drilled on the frontal bone served as reference lead to all recordings, and all recording electrodes were wired to a connector (Amphenol). The connector, cannulas and a pair of rods placed anteriorly and posteriorly on the skull to replace the head in the stereotactic frame for future experiments without inducing pain in an awake animal (Rod fixation system by Kopf Inst, Tujuma, CA) were cemented to a plastic skull cap (Velasco, 1968).

The animals were left to recover, and one week later their heads were replaced in the stereotactic frame, using the rod system and maintaining the body inside a transparent plastic cage that allowed the follow up of the animal's behavior, with an exit for the neck to restrict motion and avoid excessive traction on the rod fixation system.

### 2.1. Injections of supramaximal doses of penicillin

Fourteen animals were used to determine the location and extension of the convulsive areas in the brain stem. In those animals, 32 target points along the brain stem were injected on the right side with a solution containing 500 UI Na penicillin/ $\mu$ l (850 mM, pH 6.8 to 7.2, 484 mEq Na/L) at a rate of 0.1  $\mu$ l/5 s while EEG from RAS, LAS, RSS and LSS as well as EMG-MUA from right and left posterior neck muscles were recorded. A careful time lock chart of the animal's behavior was kept throughout the experiment. The solution

was injected by means of a Hamilton syringe (Hamilton Co, Reno, NV) beginning with 0.5  $\mu\text{l}$  (250 IU NaPC) and increasing 0.5  $\mu\text{l}$  every 30 min until a convulsive effect was observed or a maximum of 2.0  $\mu\text{l}$  (1000 NaPC) were injected in each target point. At the end of the experimental session, the site of injection was marked with 10% silver nitrate, injecting a volume similar of that of the penicillin solution used during the experiment, to determine the precise area covered by the injection. Animals used for more than one injection had an interval of 4 to 8 days between injections during which EEG and clinical observations did not show residual effects.

## 2.2. Dose–response curves

Once the convulsive area for penicillin injection in the brain stem was determined (see results), 11 animals were used to determine the convulsive threshold for penicillin, the pharmacological dose response curves and the relationship between the different type of convulsive effects induced with the amount of penicillin injected and the precise stereotactic coordinates of the injections within the convulsive area.

Animals were prepared as described above, adding recordings of EEG and MUA from the injected place and ipsilateral anterior sigmoid gyrus. MUA recordings were performed through a bipolar concentric stainless steel electrode, made from a 25 gauge cannula, isolated but at a distal ring of 2 mm and a inside wire isolated but at the tip that was electrolytically sharpened to a size of 40–80  $\mu$  (40 Kilohms of impedance). Recordings were amplified and filtered through a 3000 Hz bandpass filter coupled with a stair cage generator and audiomonitor. Through a Smith trigger MUA over 100% background noise were selected and counted by means of the stairs cage generator. Each reset represented the count of 25 of the selected units (Velasco et al., 1975). Signal from the EMG recording was analyzed in the same manners as MUA.

In these animals, penicillin solution injected was adjusted to approach physiological parameters: 212 mM, 322 mOsm/l, pH 6.8 to 7.2 and Na content of 150 mEq/l. The solution contained 125

IU of penicillin/ $\mu\text{l}$  and was injected in volumes of 0.1  $\mu\text{l}$  (12.5 IU) at the same rate of 0.1  $\mu\text{l}/5$  s repeated every 10-min until a convulsive effect was obtained or a maximum of 1.0  $\mu\text{l}$  (125 IU) was injected. The place of injection was marked with silver nitrate as previously described.

The relationship between the injected site determined by their stereotactic coordinates (AP, lateral and height) and the seizure type obtained (focal motor, myoclonic tonic and tonic clonic) was statistically evaluated obtaining a mean value for each stereotactic coordinate in mm for each one of the seizure patterns and using Friedman test (*F*-test) to determine differences in mean values between different seizure patterns. Student *t*-test served to determine the significance of differences in the position of injection in the three coordinates that induced a given seizure pattern in regard to the coordinates of injections that gave other seizure patterns. Relationships of NaPC dose (in IU) with different clinical and EEG seizures were evaluated through Student *t*-test.

Determination of ED 50 for generalized tonic-clonic seizure (GTC) and dose response curve were performed with observations made using the different concentration of sodium penicillin in all 25 animals.

## 2.3. EEG, EMG and MUA relationships

When EEG, MUA and EMG paroxysmal discharges were not evidently time locked they will be only described in results. When they appeared time locked temporal relationship between the cortical EEG spike with the increments and decrements of MUA at the cerebral cortex (Cx MUA), brain stem convulsive area (MT-MUA) and EMG (EMG-MUA) were analyzed.

The increments and decrements of MUA were determined in relation to the apex of the EEG spike while the polygraphic recording was speeded at 50 mm/s. Increments or decrements in MUA occurring every 100 ms were quantified along 1 s, starting 500 ms before the apex of the EEG spike. Significance of changes was determined through a Student *t*-test.

At the end of the experiments animal were sacrificed by a lethal dose of pentobarbital and

their brains perfused through intracarotid injection of 10% buffered formaldehyde. The injected sites were examined in 10  $\mu$  thick section stained with Luxol-fast blue.

### 3. Results

#### 3.1. Location and extension of the convulsive area

A total of 36 injections using penicillin solution 500 UI/ $\mu$ l were performed in 12 different targets along the brain stem of 14 cats. All injected sites were identified in histological sections. At the mesencephalon they included: Mesencephalic tegmentum (MT) (from  $A = 1.0$  to  $3.5$ ,  $L = 1.5$  to  $3.5$  and  $H = +2.0$  to  $-4.0$ ) covering mostly the area of the mesencephalic reticular formation (MRF) and surrounding tegmentum dorsal and lateral to the red nucleus ( $n = 10$ ); the pes peduncle including substantia nigra (SN) and cerebral peduncle ( $n = 3$ ) and tectal area in the medial geniculate body, superior and inferior colliculi and periaqueductal gray ( $n = 4$ ). In the pons and medulla they included the pontine reticular formation (magnocellular nucleus) ( $n = 7$ ), raphe nucleus ( $n = 5$ ), superior cerebellar peduncle ( $n = 2$ ), facial nucleus ( $n = 1$ ), vestibular nucleus ( $n = 1$ ) and bulbar reticular formation (BRF) ( $n = 3$ ).

Nine out of ten injections in MT induced clinical and EEG seizures with amounts between 250 and 500 IU (mean 428 IU). Seizure started  $7.3 \pm 2.6$  min after injection as a focal contralateral myoclonus, evolving to generalized myoclonus in all, associated to generalized spikes or polyspikes EEG complexes and seven cases ended with repeated generalized tonic clonic (GTC) clinical and EEG seizures. None of the injections outside MT induced seizures even when the total dose injected reached 1000 IU of penicillin. Eight out of ten injections in PRF and BRF induced EEG synchronization with persistent spindle bursts associated with sleep in animals otherwise reactive and 3/5 injections in the raphe nucleus induced sleep, in one case associated to the whole clinical, EEG and EMG picture of REM sleep. Injections in the vestibular nuclei induced tonic contraction in extension of the four extremities and in the facial

nerve tonic facial ipsilateral contraction and salivation, neither one associated to any EEG paroxysmal discharges. The rest of the injections did not elicit detectable effects (Fig. 1)

#### 3.2. Clinical and EEG seizure patterns in relation to penicillin dose and injected site.

Injection of sodium penicillin solution 212 mM (322 mOsm, 125 IU  $\mu$ l) was performed in 12 targets within the previously defined convulsive area. Injections started at 12.5 IU (0.1  $\mu$ l) and were progressively increased 0.1  $\mu$ l every 10 min until GTC were obtained or a maximum of 1.0  $\mu$ l (125 IU) were injected. All injections induced a contralateral facial myoclonus and EEG spikes more prominent in the ipsilateral Cx. As injections proceeded 10/12 times facial myoclonus extended to contralateral limbs, more prominent in the anterior limb and generalized EEG myoclonus accompanied by generalized spikes or polyspikes; in 7/12 a generalized tonic clinical and EEG seizure developed; finally, in 6/12 injections a GTC clinical and EEG convulsion developed. The amount of penicillin necessary to induce the different clinical seizure patterns was significantly larger for contralateral myoclonus ( $P > 0.02$ ), generalized myoclonus, tonic and GTC ( $P < 0.001$ ) than for facial myoclonus. There were also significant differences between generalized myoclonus and tonic seizure ( $P < 0.05$ ) and GTC ( $P < 0.002$ ). DE 50 for GTC seizures was 126 IU. The amount of penicillin necessary to induce EEG isolated spikes was significantly lower than for tonic ( $P < 0.01$ ) or GTC ( $P < 0.001$ ) EEG paroxysms (Table 1 and Figs. 2 and 3). None of the stereotactic coordinates (AP, lateral and height) correlated with any particular type of clinical or EEG pattern.

It was remarkable that clinical facial myoclonus preceded by seconds or minutes the onset of Cx EEG spikes.

#### 3.3. Clinical, EEG, and EMG relationships

Focal EEG spikes and paroxysmal increase in MUA in MT were the first events to appear after injection of NaPC, they progressively increased

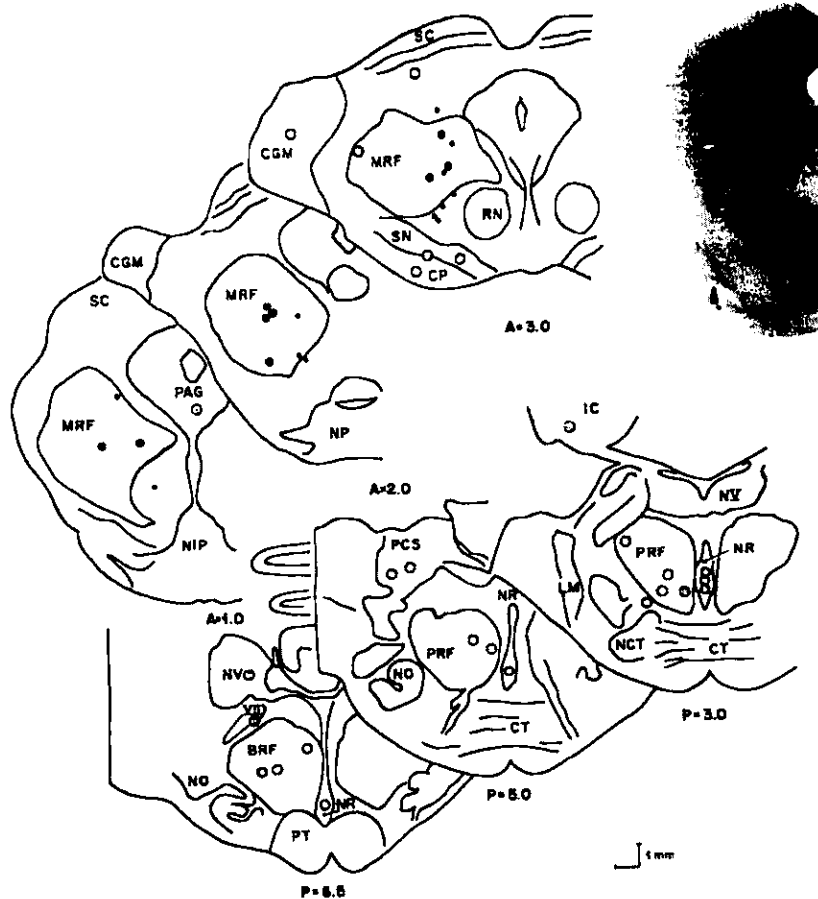


Fig. 1. Diagrams of coronal sections of the cats brain stem from  $A = 3.0$  to  $P = 6.5$  taken from the stereotactic atlas by Snider and Niemer (1961), showing the injected sites with high concentrated penicillin solution (big filled and clear dots) and low concentrated solution (small dots). All injection but one within the mesencephalic tegmentum elicited some pattern of clinical and EEG seizure formation (filled dots), whereas none outside this area induced clinical and EEG seizures (clear dots). Abbreviations: BRF, bulbar reticular formation; CGM, medial geniculate body; CP, cerebral peduncle; CT, trapezoid body; IC, inferior colliculus; LM, medial lemniscus; MRF, mesencephalic reticular formation; NCT, nucleus trapezoid body; NIP, nucleus interpeduncularis; NO, nucleus olivaris; NR, raphe nucleus; NV, vestibular nucleus; NV, trigeminal nucleus; PAG, periaqueductal gray; PCS, superior cerebellar peduncle; RN, red nucleus; SC, superior colliculus; SN, substantia nigra. In the left upper corner a microphotograph of a colorant mark using 0.5  $\mu$ l is presented to give an idea of the diffusion along the needle tract of the injected solution.

and were accompanied by clinical and EMG focal myoclonus, before any paroxysmal activity appeared in the motor Cx. Increments in MUA in MT and EMG did not correlated in time with MT EEG spikes (Fig. 4).

When Cx EEG spikes appeared, paroxysmal discharges in MUA at Cx, and EMG became synchronous with the EEG spikes. In order to determine the precise time relationship between

these events, EEG individual spikes were analyzed in relation to MUA increments in different structures. Taking the apex of cortical EEG spike as time '0', it was observed that Cx-MUA had a significant increase 200 ms before the apex, accompanied by a progressive increase in EMG-MUA. Increments in MT-MUA occurred at time '0' and accompanied by further increase in EMG-MUA and decrease in Cx-MUA (Fig. 5).

Table 1  
Summarizes the observation ( $n = 12$ ) when injecting 212 mM NaPC<sup>a</sup>

Seizure type	Number of events	Range of penicillin dose in international units (IU)	$\bar{X}$	SE	$P <$
Facial myoclonus	12	12.5–35.0	19.4	2	–
Contralateral myoclonus	10	25.0–50.0	38.5	7.8	0.018
Generalized myoclonus	10	25.0–100.0	54.2	9	0.001
Generalized tonic	7	35.0–125.0	94.1	18.3	0.0001
Generalized tonic-clonic	6	62.5–125.0	117.5	14.8	0.0001
Egg pattern					
Isolated spikes	9	12.5–87.5	33	8.2	–
Polyspikes	10	25.0–87.5	57	8.8	NS
Tonic	8	25.0–125.0	91.7	17.5	0.001
Tonic-clonic	7	87.5–125	108.1	15.6	0.0001

<sup>a</sup> In all instances, facial myoclonus and isolated EEG spikes and/or polyspikes were induced. Since the maximal volume of penicillin was 1.0  $\mu$ l (125 IU) only half of the injections were followed by GTC convulsions. The mean values of the amount of penicillin injected inducing different clinical and EEG patterns are presented and one may observe that they were significantly lower for facial myoclonus and isolated spikes than for other clinical and EEG patterns.

## 4. Discussion

### 4.1. Anatomical location of the convulsive area

One limitation of the present study is the lack of control on the diffusion of NaPC away from the injected site as well as the possibility of back reflux along the needle tract. However, spreading to neighbor structures as a cause of the convulsive effect is unlikely as doses of NaPC eight times larger those required to induce GTC seizure and up to 80 times the threshold dose for facial myoclonus, failed to induce any seizure event when injected 2–3 mm away from the MT. Spreading through the blood stream to distant sites as the cause of seizures is even more remote as systemic administration of NaPC requires about 30 000 IU/kg of animals weight to induce GTC seizures (Quesney et al., 1977), i.e. over 7000 times the amount used in this study. On the other hand, the cannula guide used to orient the needle of the Hamilton syringe within brain stem was intended to prevent spreading of NaPC as the needle traversed other cortical and subcortical areas and although the colorant used (silver nitrate) and NaPC solution may have different diffusion rates than NaPC, visual inspection of the anatomical sections gave an idea of how little colorant reflux is obtained injecting from 0.5 to 1.0  $\mu$ l, that in no

instance exceeded 2 mm and most likely injections of 0.1  $\mu$ l cover even smaller areas (Fig. 1). Finally, studies on the diffusion within the cerebral parenchyma using (C14) labeled NaPC solution shows a very slow diffusion rate of about 1.5 mm/h (Noebels and Pedley, 1977) while epileptic events in present experiments develop within 10 min after the injection of NaPC. Using the technique of current-source-density analysis, Eiselt et al. (1998) demonstrated that NaPC applied subpially induce a focus of spikes within an area of 3 mm, beyond which electrical potential seem to be involved in inhibition rather than excitation of epileptic activity.

The convulsive area in the MT of the cat herein described closely corresponds to the convulsive area described in the rabbit mesencephalon using threshold electrical stimulation (Bergmann et al., 1963). Apparently, higher intensity current (Kreindler et al., 1958) or larger volumes and doses of penicillin (Ralston and Langer, 1965) induce seizures from other parts of the reticular formation. NaPC up to 1000 IU did not produce seizures when injected into bulbar and pontine reticular formation and instead animals developed a clinical and EEG pattern of sleep, as had been previously described injecting pentylenetetrazol in the same areas (Velasco et al., 1983). When injected in the raphe nucleus NaPC induced either

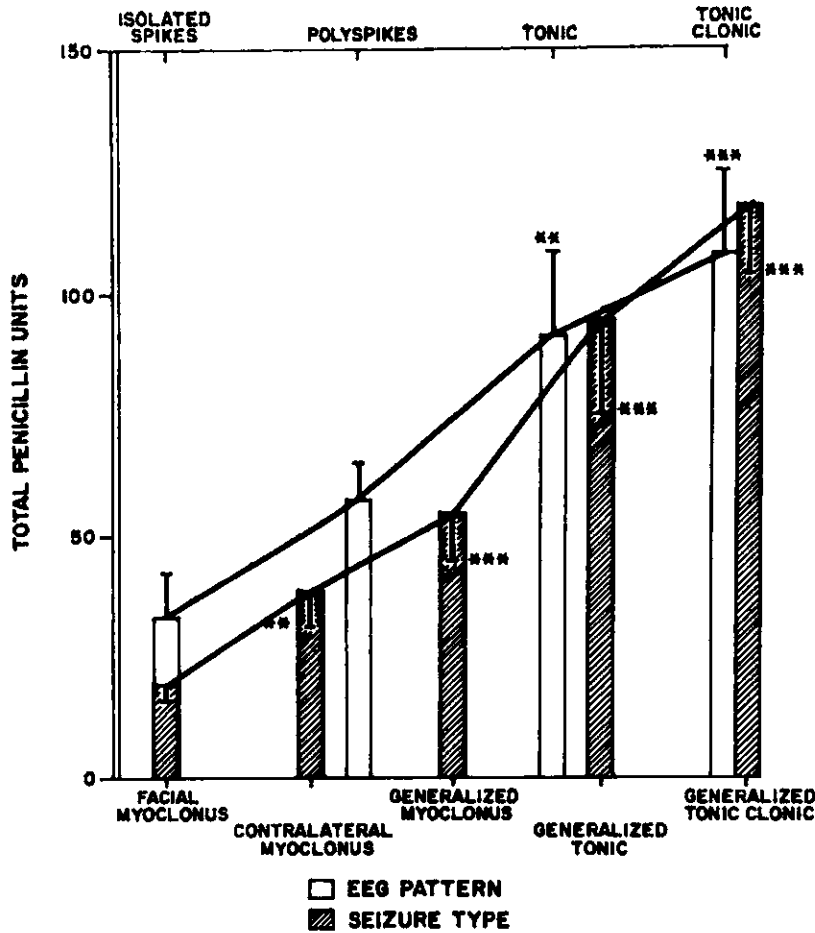


Fig. 2. Dose response curve in relation to penicillin dose. Filled bars, clinical seizure pattern; empty bars, EEG pattern, showing the mean and standard errors to elicit facial myoclonus and other clinical patterns and also to elicit spikes and tonic or GTC-EEG seizures. \*\* $P < 0.02$ , \*\*\* $P < 0.001$

spindle bursts or paradoxical sleep reported by others (Martinez et al., 1997).

The convulsive area was restricted to the intermediate part of the MRF (Van der Kooy, 1987) and the tegmental area dorsal and lateral to the red nucleus. It was identified using both isoosmolar, low sodium content NaPC solution, that has been described to have specific antigabaergic effect (Wong and Prince, 1979; McCandless and Finesmith, 1992) as well as hyperosmolar, high sodium content solution that may have other depolarizing effects (Ayala and Vasconsetto, 1970). Injections ventral to this area did not induce either clinical or EEG epileptic events, as has

been described before using other antigabaergic substances in the substantia nigra (SN) (Arnt and Scheel-Kruger, 1980; Gunne et al., 1988). GABA activation in the SN seems to be related to the control of seizures initiated elsewhere or induced by systemic convulsants (Iadarola and Gale, 1982). On the contrary, kainic acid induce strong motor seizures when injected in the SN, but not in the MT (Maggio et al., 1990) and recent experiments in our laboratory replicate most of the observations made with NaPC in the MT using bicuculline, a specific GABA A receptor antagonist (Velasco et al., in preparation), suggesting that within the mesencephalon there are different

### DOSE-RESPONSE CURVE FOR GENERALIZED TONIC CLONIC SEIZURE

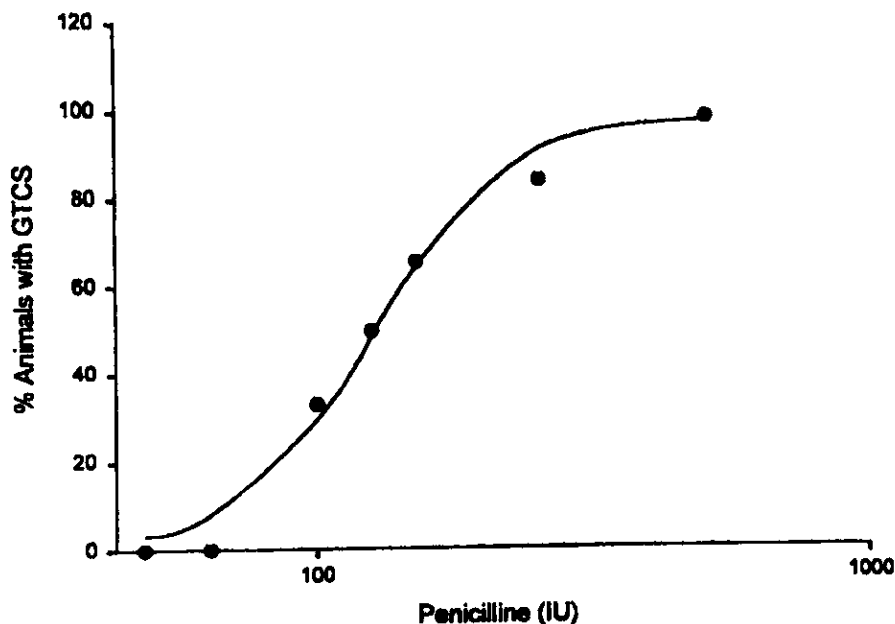


Fig. 3. Dose-response curve for GTC. This curve was obtained using the information derived from all animals that received NaPC in MT, in iso and hyperosmolar concentrations and through a non-linear regression sigmoidal curve estimated by means of a computer program named Sigma Plot for Windows.

biochemical mechanisms to induce and control seizures. In the cerebral peduncle injection of 500 IU did not produce clinical or EEG paroxysms, which makes unlikely that the convulsive effects produced by mesencephalic NaPC are due to antidromic excitation of the motor cortex via pyramidal tract.

Injection in the colliculi did not produce detectable EEG or clinical changes, contrary to that described injecting bicuculline in rats (Tsutsui et al., 1992).

#### 4.2. Seizure pattern

NaPC isoosmolar solution injected in progressive doses in the MT invariably induced focal motor seizures before other seizure patterns. Although in our experiments we remained attached to the use of 212 mM solution (isoosmolar) to avoid the effect of osmolar or Na content variables as causes of depolarization, in 2 instances

using 8.2 mM solution and 2.5 IU NaPC dose, we could induce focal EEG spikes and focal myoclonus, which is the same dose used in cortical NaPC injection to induce focal spikes (Lüders et al., 1980; Chatt and Ebersole, 1988). Since there is not anatomical or physiological evidence of a topographical organization in the MT, one may speculate that focal myoclonus resulted from orthodromic or antidromic excitation to the motor cortex. However, as illustrated in Fig. 4, distinct MT EEG spikes and muscular myoclonus were present before EEG or MUA paroxysms appeared in the motor Cx. Myoclonus has been produced by NaPC injected in the brain stem (Ralston and Langer, 1968) and other circumstances affecting the brain stem (Hallet et al., 1977; Chung and Von Woert, 1986) and have been proposed to result from propagation of brain stem epileptic activity to the spinal cord, through midline descending reticulo-spinal fibers originated in the pontine and bulbar reticular

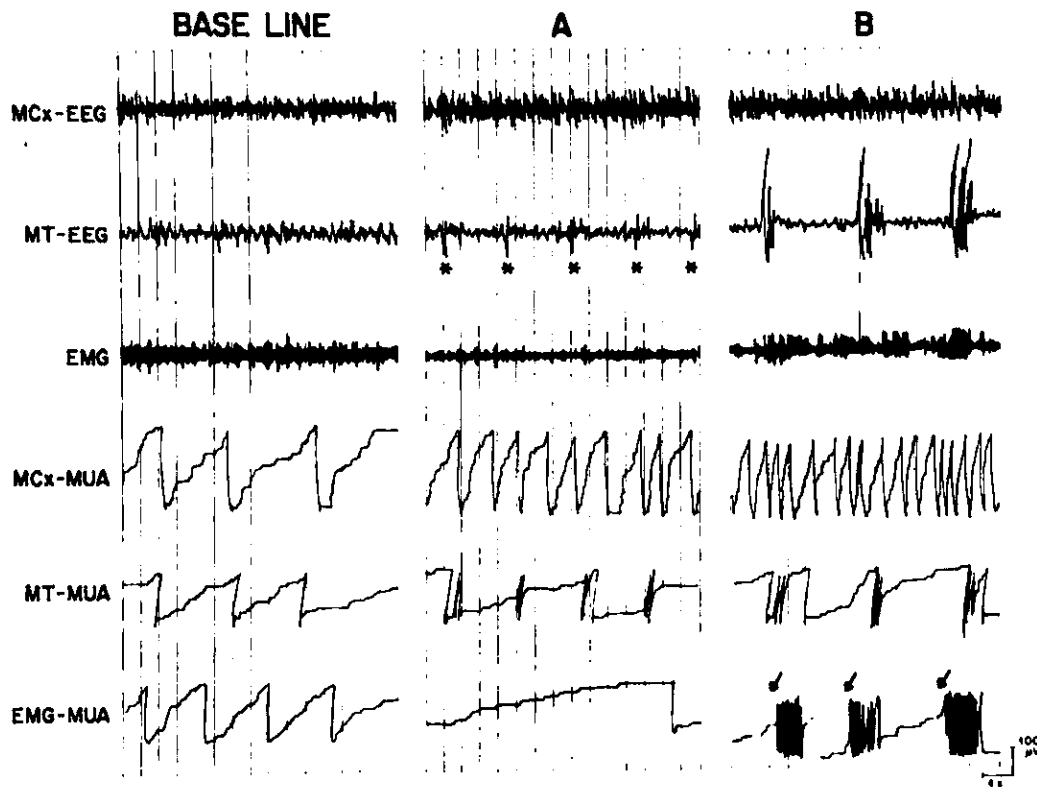


Fig. 4. Sequence of events induced by NaPC in MT. EEG Cx, motor cortex; EEG-MT, mesencephalic tegmentum; EMG, muscular recording from neck muscles; MUA, integration of multiple unit recording from the Cx, MT and EMG, each reset of the staircase represents the count of 25 of the selected units which were those with an amplitude above 100% the noise level. A: 3 min after injection of 12.5 IU penicillin EEG spikes accompanied by MUA paroxysms at the MT (asterisks) appear in the absence of Cx-EEG, and MUA and EMG-MUA changes. B: As NaPC dose increase (25 IU), MT EEG and MUA paroxysms became more prominent and EMG discharges appear (arrows); there is a steady increase in Cx-MUA but still in the absence of Cx-EEG paroxysms. Notice that MT-EEG and MUA and EMG discharges are not precisely related in time.

formation and raphe nucleus (Newman, 1995). Since no clinical seizure were induced injecting NaPC in those nuclei, it is unlikely that MT paroxysmal activity used these pathways to propagate to the spinal cord. Besides, experimental evidence has been provided that focal myoclonus originated in the forebrain (for review see Gale and Browning, 1988) and therefore, it is possible that myoclonus result from propagation through other forebrain cortical or subcortical structures different from the motor Cx.

On the other hand, as NaPC dose was increased, seizure progression closely resembled 'kindling' induced by temporal lobe amygdala stimulation and although electrical stimulation of

MRF has been unsuccessful in eliciting kindling (Goddard et al., 1969), the possibility that MT paroxysmal activity propagates using the same forebrain structures of amygdala kindling remains. Further experiments using the epilepsy model herein described and recording EEG and MUA of different cortical and subcortical structures in relation to clinical events are necessary to elucidate this matter.

#### 4.3. EEG, EMG, MUA and clinical seizures relationships

Focal EEG spikes and increased MUA resulting from local application of NaPC in the brain



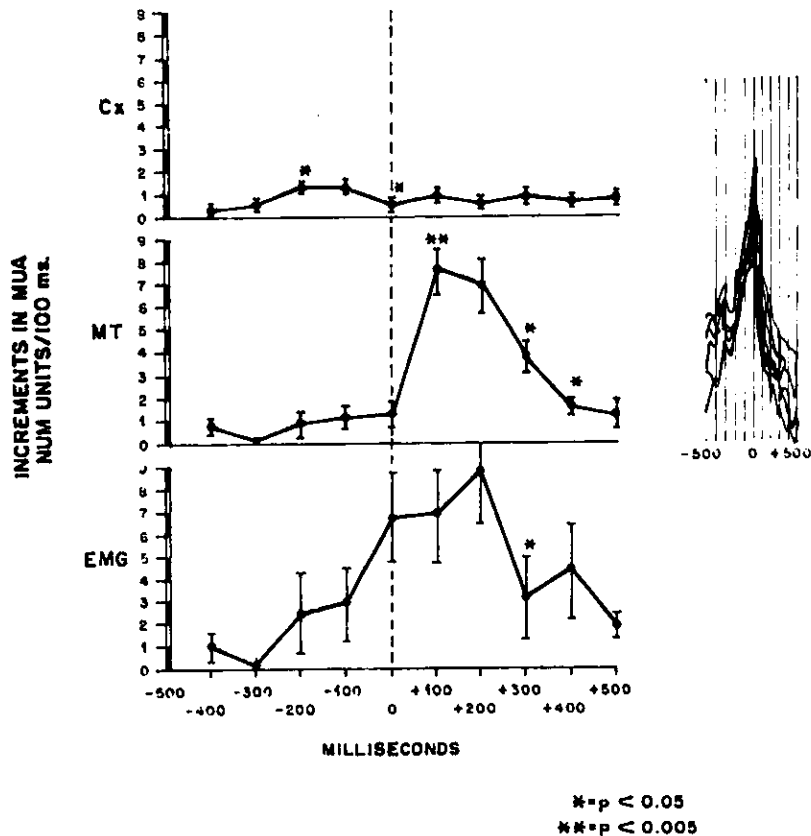


Fig. 5. Increments and decrements in cortical (Cx), mesencephalic tegmentum (MT) and EMG multiple unit activities (MUA) in relation to Cx-EEG spikes (right side). EEG spike apex was considered time '0' and changes in MUA evaluated for each structure in 100 ms epochs along 1 s, starting 500 ms before the apex. From 20 observations, the mean value of MUA for each epoch and each structure was obtained and compared with that of the immediately preceding epoch, and the significance of changes evaluated through a Student *t*-test. It can be seen that discrete but significant increase in Cx-MUA anticipated EEG spike apex, while more prominent increments in EMG-MUA and MT-MUA occurred at time '0' and 100 ms after, respectively. Increase in MT-MUA was coincident with further increase in EMG-MUA and decrease in Cx-MUA.

stem have been reported before (Ralston and Langer, 1965; Mameli et al., 1991). Since those experiments were performed in anesthetized or paralyzed animals by means of muscular relaxants or brain stem transections, temporal relationships between electrophysiological and clinical events were difficult to assess.

In our experiments particular interest was paid to these temporal relationships and it was clear that focal EEG spikes and increased MUA in the MT anticipated clinical and EMG seizure and Cx EEG spikes. As NaPC dose was increased, focal MT EEG spikes became accompanied by EMG and clinical myoclonus before Cx EEG spikes

appeared. EEG spikes and increase MUA in MT increase in EMG-MUA and clinical seizures were not time locked, which again makes unlikely that seizure activity in MT propagates by direct spinoreticular fibers or through the motor Cx.

When Cx EEG spikes appeared, the clinical seizure patterns was generalized myoclonus and at that moment Cx EEG spikes and increase in MUA in Cx, MT and EMG and clinical seizure became time locked. Fine analysis of time correlation indicates that increase in Cx MUA anticipated increase in MUA at MT and EMG and that was a simultaneous increase in MUA at MT and EMG at the apex of EEG spike, which

indicates that Cx is facilitatory of myoclonic seizure activity in the brain stem.

### Acknowledgements

This work was partially supported by the Grant 0797P-M9506 CONACYT, México, D.F.

### References

- Arnt, J., Scheel-Kruger, J., 1980. Intranigral GABA antagonists produce dopamine-independent biting in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 62, 51–61.
- Ayala, G.F., Vasconsetto, C., 1970. Penicillin as epileptogenic agent: its effect on isolated neuron. *Science* 167, 1257–1260.
- Bergmann, F., Costin, A., Gutman, J., 1963. A low threshold convulsive area in the rabbit's mesencephalon. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 15, 683–690.
- Chatt, A.B., Ebersole, J.S., 1988. Comparisons between strychnine and penicillin epileptogenesis suggest that propagating epileptiform abnormalities require potentiation of the thalamo-cortical circuitry in neocortical layer 4. *Exp. Neurol.* 100, 365–380.
- Chung, E., Von Woert, M.H., 1986. DDT myoclonus: site of 'myoclonus center' in brain. In: Fahn, S., et al., (Eds.), *Adv. Neurol.* 43 Myoclonus. Raven Press, New York, pp. 569–575.
- Crowell, R.M., 1970. Distant effect of a focal epileptogenic process. *Brain Res.* 18, 137–154.
- Eiselt, M., Zweiner, U., Wagner, H., Schindler, T., 1998. Intracortical functional heterogeneity in area striate during penicillin induced spikes in rabbits. *Epilepsy Res.* 30, 177–186.
- Fromm, G.H., Faingold, C.L., Browning, R.A., Burnham, W.M., 1987. *Epilepsy and the Reticular Formation*. Alan R. Liss, New York.
- Gale, K., Browning, R.A., 1988. Anatomical and neurochemical substrates of clonic and tonic seizures. In: Dichter, M.A. (Ed.), *Mechanisms of Epileptogenesis. The Transition to Seizure*. Plenum Press, New York, pp. 111–152.
- Gloor, P., Quesney, L.F., Zumstein, H., 1977. Pathophysiology of generalized penicillin epilepsy in the cat: the role of cortical and subcortical structures I. Topical application of penicillin to the cerebral cortex and to subcortical structures. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 43, 79–94.
- Goddard, G.V., McIntyre, D.C., Leitch, C.K., 1969. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* 25, 295–330.
- Gunne, L., Bachus, S., Gale, K., 1988. Oral movements induced by interference with nigral GABA neurotransmission: relationship to tardive dyskinesias. *Exp. Neurol.* 100, 459–469.
- Hallet, M., Chadwick, D., Adam, J., Marsden, C.V., 1977. Reticular reflex myoclonus: a physiological of human post-hypoxic myoclonus. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 40, 253–264.
- Horn, E., Gehring, B., 1996. Expression of epileptiform activity induced penicillin focus within the posterior thalamus in the awake rat. *Pharmacol. Behav.* 54, 759–770.
- Iadarola, M.J., Gale, K., 1982. Substantia nigra: site of anti-convulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid. *Science* 218, 1237–1240.
- Kreindler, A., Zuckerman, E., Steriade, M., Chimoid, D., 1958. Electroclinical features of convulsions induced by stimulation of brain stem. *J. Neurophysiol.* 21, 430–436.
- Lüders, H., Bustamante, L., Zablow, L., Krinsky, A., Goldensohn, E.S., 1980. Quantitative studies of spike foci induced by minimal concentrations of penicillin. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 48, 80–89.
- McCandless, D.W., Finesmith, R.B., 1992. Chemically induced models of seizure. In: Bulton, A., Baker, G., Butterworth, R. (Eds.), *Neuromethods, Animal models of Neurological Disease*, vol. 22. The Human Press, pp. 133–151.
- Maggio, R., Liminga, U., Gale, K., 1990. Selective stimulation of Kainate but not quisqualate or NMDA receptors in substantia nigra evokes limbic motor seizure. *Brain Res.* 528, 223–230.
- Mameli, O., Melis, F., Tolu, E., Carie, M.A., de Rui, P.L., Azzena, G.B., 1991. Penicillin-induced paroxysmal activity in brain stem neurons. *Physiol. Behav.* 49, 631–634.
- Martinez, A., Fernández-Mas, R., Fernández-Guardiola, A., 1997. Efecto de microinyecciones repetidas de penicilina en el núcleo del rafe en la organización del sueño durante un registro de 23 hrs. en el gato. *Salud. Mental. (suppl)* 20, 23–31.
- Noebels, J.L., Pedley, T., 1977. Anatomic localization of topically applied (14 C) penicillin during experimental focal epilepsy in cats neocortex. *Brain Res.* 125, 293–303.
- Newman, D.B., 1995. Anatomy and neurotransmitters of brain stem motor system. In: Fahn, S., Hallet, M., Lüders, H.D. (Eds.), *Advances in Neurology*, vol. 67. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 219–242.
- Pockberger, H., Rappelsberg, P., Petsche, H., 1984. Penicillin-induced epileptic phenomena in the rabbit's neocortex II. Laminar specific generation of interictal spikes after the application of penicillin to different cortical depths. *Brain Res.* 309, 261–269.
- Quesney, L.F., Gloor, O., Kratzenberg, E., Zimstein, H., 1977. Pathophysiology of generalized penicillin epilepsy in the cat: role of cortical and subcortical structures. I Systematic application of penicillin. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 42, 640–655.
- Ralston, B.L., Langer, H., 1965. Experimental epilepsy of brain stem origin. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 18, 325–333.
- Redecker, C., Bruchl, C., Hagemann, G., Binus, O., Witte, O.W., 1997. Coupling of cortical and thalamic metabolism in experimentally induced visual and somatosensory focal epilepsy. *Epilepsy Res.* 27, 127–137.

- Snider, R.S., Niemer, W.T., 1961. A stereotaxic atlas of the cat brain. The University of Chicago Press, Chicago.
- Tsutsui, J., Terra, V.C., Oliveira, J.A.C., Garcia Cairasco, N., 1992. Neurootological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic-like seizures induced by microinjection of bicuculline into the interior colliculus. I. Effects of midcollicular knife cuts. *Behav. Brain Res.* 52, 7–17.
- Van der Kooy, D., 1987. The reticular core of the brain stem and its descending pathways: anatomy and function. In: Fromm, G.H., Fainglod, C.L., Browning, R.A., Burnham, W.M. (Eds.), *Epilepsy and the Reticular Formation*. Alan R. Liss, New York, pp. 9–23.
- Velasco, F., Velasco, M., Estrada-Villanueva, F., Machado, J., 1975. Specific and non specific multiple unit activities during the onset of pentylenetetrazol seizures. I. Intact animals. *Epilepsia* 16, 207–214.
- Velasco, F., Velasco, M., Romo, R., 1983. Push-pull perfusion of pentylenetetrazol in the brain stem of 'encephale isole' cats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 56, 521–527.
- Velasco, F., Velasco, M., 1990. Mesencephalic structures and tonic-clonic generalized seizures. In: Avoli, M., Naquet, R. (Eds.), *Generalized Epilepsy*. Birkhauser, Boston, pp. 368–384.
- Velasco, M., 1968. Removable plastic skull cap for chronic preparation. *Bol. Estud. Med. Biol.* 14, 129–134.
- Wong, R.K.S., Prince, D.A., 1979. Dendritic mechanisms underlying penicillin induced epileptiform activity. *Science* 204, 1228–1231.