



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**EFFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DEL MK-801 Y AP-5, ANTAGONISTAS DEL  
GLUTAMATO, EN EL NÚCLEO GIGANTOCELULAR SOBRE LAS CRISIS INDUCIDAS  
POR PENTILENTETRAZOL EN RATAS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**Luis Jardón Aguillón**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Martha Leticia Jiménez Pardo**

**VOCAL:**                   **Profesor: Ignacio Camacho Arroyo**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Joaquín Manjarrez Marmolejo**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: Guillermo Celestino Cardoso Saldaña**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: María Alejandra Morinelli Astorquizaga**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA DE LA FORMACIÓN RETICULAR, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MVS**

### **ASESOR DEL TEMA:**

**Joaquín Manjarrez Marmolejo**       \_\_\_\_\_

### **SUSTENTANTE:**

**Luis Jardón Aguillón**               \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

**ESTA TESIS ESTA DEDICADA A TODAS LAS PERSONAS QUE ME BRINDARON SU APOYO, SU AMISTAD, Y CARIÑO, ENUMERARLAS A TODAS ES IMPOSIBLE.**

**EN PRIMER INSTANCIA AGRADEZCO A MIS PADRES POR EL APOYO A LO LARGO DE ESTOS AÑOS, A MI HERMANA POR AYUDARME CON LAS IMÁGENES DE ESTA TESIS.**

**A MIS ABUELITOS MARCOS, EN PAZ DESCANSE, GUILLERMINA, RAMÓN Y EN ESPECIAL A MI ABUELITA TETE, DE QUIEN GUARDO MIS MAS ANTIGUOS Y FELICES RECUERDOS.**

**A MIS TÍOS JAVIER, IRENE, ALEJANDRO, ALBERTO, MARCOS, SERGIO, MAGDA, GUILLERMINA, CONCE, CRISTINA, ELVIRA Y LUISA, QUE ME BRINDARON SU APOYO INCONDICIONAL.**

**AL DR. JOAQUÍN MANJARREZ POR PERMITIRME REALIZAR ESTE PROYECTO Y POR INTRODUCIRME EN LA INVESTIGACIÓN BÁSICA Y A DON ALFONSO POR AYUDARME EN LOS MOMENTOS MAS DIFÍCILES CON LAS RATAS.**

**A MIS AMIGOS QUE ME BRINDARON SU APOYO EN EL PEOR MOMENTO DE MI VIDA Y QUE ESTUVIERON SIEMPRE AL PENDIENTE: FRANCISCO, PAUL, RICARDO, OLGA, ROSALBA Y EN ESPECIAL A ALEJANDRA QUIEN SIEMPRE ME DIO SU MEJOR CARA AÚN EN LOS PEORES DÍAS, QUE ME DIO SU APOYO Y NUNCA ME ABANDONÓ. A MIS COMPAÑEROS DEL L-125 CON QUIENES COMPARTÍ TANTOS MOMENTOS Y RECUERDOS, IVÁN, ALFONSINA, MARU, FRANCISCO, AYLIN, GLADYS, ALEJANDRO, ALEJANDRA, YAZMIN, DRA. ISABEL, M EN C ALBERTO, BRENDA, FÁTIMA Y EN ESPECIAL A LA DRA. ELENITA, QUIEN SIEMPRE ME APOYÓ AÚN CUANDO ELLA PASABA POR MOMENTOS DIFÍCILES.**

**FINALMENTE A GEORGIE CON QUIEN COMPARTÍ TANTOS GRATOS MOMENTOS Y ME DEJÓ TAN BELLOS RECUERDOS, DE QUIEN APRENDÍ MUCHO. OJALA HUBIERAMOS PODIDO PASAR MAS TIEMPO JUNTOS.**

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN .....                                       | 1  |
| ANTECEDENTES .....                                       | 3  |
| DEFINICIÓN DE EPILEPSIA Y SUS CAUSAS .....               | 3  |
| CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS .....    | 6  |
| EPILEPSIA Y ELECTROENCEFALOGRAFÍA .....                  | 9  |
| MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA .....                | 11 |
| PENTILENTETRAZOL .....                                   | 13 |
| GLUTAMATO Y EPILEPSIA .....                              | 14 |
| SUBTIPOS DEL RECEPTOR DE GLUTAMATO .....                 | 17 |
| EL RECEPTOR A NMDA .....                                 | 21 |
| MK-801 .....   | 25 |
| AP-5 .....   | 26 |
| FORMACIÓN RETICULAR BULBAR Y NÚCLEO GIGANTOCELULAR ..... | 28 |
| OBJETIVOS .....  | 30 |
| PARTE EXPERIMENTAL .....                                 | 31 |
| RESULTADOS .....   | 33 |
| DISCUSIÓN .....  | 45 |
| CONCLUSIONES .....                                       | 49 |
| REFERENCIAS .....  | 50 |

## INTRODUCCIÓN

La epilepsia es el padecimiento neurológico más común del hombre y del que se tienen registros más antiguos remontándose al año 1000 A.C. atribuida a demonios, hechicería e influencia de los astros; fue hasta el 400 A.C. en que Hipócrates consideró que tenía una causa natural aunque desconocida (3). Se le define como una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes y autolimitadas que se deben a una descarga neuronal excesiva (crisis epiléptica) (2,3,4). El 3% de la población mundial es propensa a sufrir una crisis epiléptica en algún momento de su vida, siendo mayor la posibilidad en la infancia y la vejez, pero solo el 1% será diagnosticado con epilepsia (2,5). Este padecimiento puede ser tanto inducido por distintos eventos como tener un componente genético, siendo las canalopatías las que se han identificado en la mayoría de las familias con historial de epilepsia (6,7,8,10,11) junto con alteraciones en el receptor al ácido  $\gamma$ -amino butírico, subtipo A (GABA<sub>A</sub>) (9).

El glutamato es el aminoácido excitador más abundante en el sistema nervioso central (SNC), la respuesta excitadora de este neurotransmisor es mediada por receptores que se clasifican según la afinidad que presentan dichos receptores a sus agonistas en: *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), kainato y ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA) (5). Se ha observado una importante participación de los receptores NMDA en la aparición y la propagación de crisis durante la epilepsia; por ello la especial atención a sus antagonistas buscando compuestos que inhiban o disminuyan la acción del glutamato (24) como el MK-801 de tipo no-competitivo, el cual tiene actividad anticonvulsivante en varios modelos animales e incluso llegó a pruebas clínicas, sin embargo, debido a sus efectos adversos fue descartado como opción terapéutica (23). El AP-5, de tipo competitivo, fue uno de los primeros antagonistas a glutamato, selectivo para receptores a NMDA (24) al ser administrado por vía intraperitoneal y tópicamente disminuyó la concentración de glutamato y la actividad epileptiforme en varios modelos de epilepsia (23,53,54).

A la fecha no se ha estudiado el efecto de estos antagonistas en el núcleo gigantocelular (NGi) sobre las crisis generalizadas producidas por pentilentetrazol (PTZ). En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se demostró que estos antagonistas en el núcleo reticularis pontis caudalis (PnC), un núcleo rostral al NGi, suprimió las crisis inducidas por PTZ (60).

## ANTECEDENTES

### Definición de epilepsia y sus causas

La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE por sus siglas en inglés) define a la epilepsia como un trastorno cerebral caracterizado predominantemente por interrupciones recurrentes e impredecibles de la función normal del cerebro, llamadas crisis epilépticas (1). Una crisis epiléptica es un evento con signos y/o síntomas debidos a actividad anormal, excesiva y sincrónica neuronal en el cerebro (1).

La probabilidad de que una persona llegue a presentar una crisis epiléptica en su vida es del 3% (2) y el 1% de la población mundial está diagnosticada (5); según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) hasta el 2001 se estimaba que había 50 millones de personas diagnosticadas (4) y, según datos del INEGI, hasta el 2006 más de un millón de Mexicanos están diagnosticados, sin embargo, el 70% de ellas logran controlar la enfermedad con fármacos anticonvulsivantes (FAC) y gran parte de ellos está en remisión (2) (Figura1).

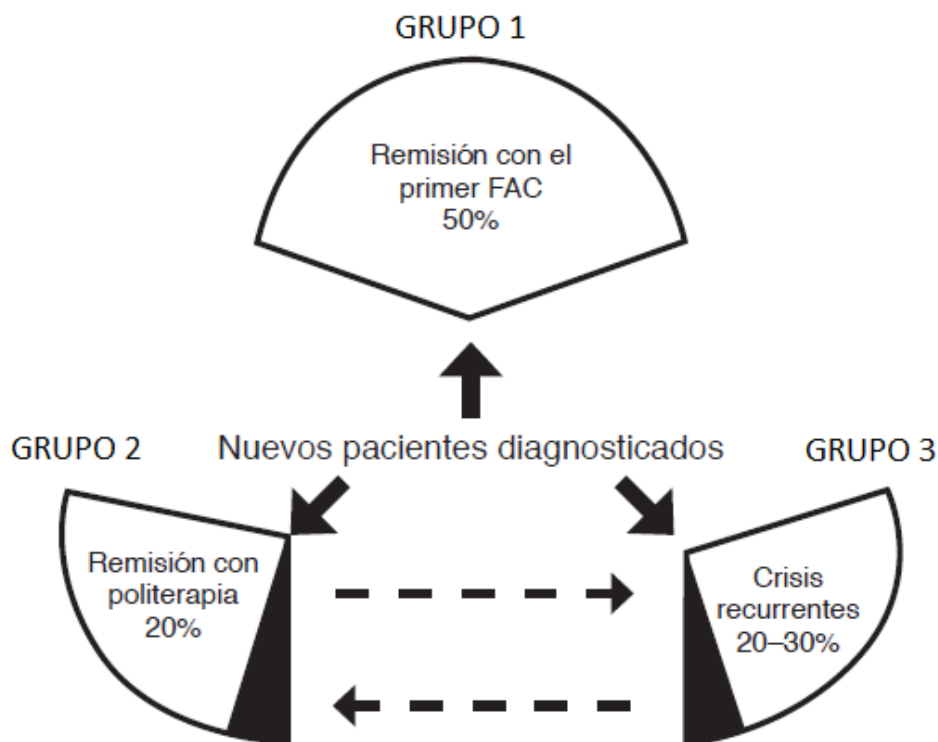


Fig1. Perspectivas de los pacientes diagnosticados con epilepsia. Tomada de cita 2.



La epilepsia puede tener causas adquiridas o genéticas: Respecto a la primera causa, las infecciones que causen meningitis, meningoencefalitis, abscesos y cisticercosis, pueden generarla de forma inmediata o retardada. Problemas vasculares como hemorragias, infarto cerebral, oclusión vascular. Un traumatismo craneal, según el tipo y severidad pueden generar epilepsia cuya latencia puede ser hasta de un año. Los tumores cerebrales primarios o secundarios, benignos o malignos causan epilepsia, 6-10% de los adultos diagnosticados con epilepsia son pacientes con algún tipo de tumor cerebral y son la principal causa de crisis parciales. Factores metabólicos como un desbalance de glucosa, sodio o calcio pueden causar epilepsia. Alcohol, medicamentos (antidepresivos, penicilinas, antimaláricos y antipsicóticos), drogas e intoxicaciones provocadas o accidentales puede producir crisis. En los países desarrollados la principal causa son problemas vasculares mientras que en los países en vías de desarrollo son infecciones bacterianas, virales o parasitarias (3,4).

La mayoría de las epilepsias idiopáticas (genéticas) son padecimientos complejos que ocurren frecuentemente entre familiares (6,7) que no exhiben un patrón hereditario Mendeliano; están involucrados varios genes, lo cual aumenta la susceptibilidad del paciente a presentar crisis (6,8). Las canalopatías son alteraciones de los canales de potasio involucrados en las convulsiones neonatales benignas familiares (6,10), de sodio involucrados en la epilepsia generalizada con crisis febriles (6,11); precisamente son los canales iónicos algunos de los sitios de unión para los fármacos antiepilépticos; se han identificado mutaciones en el gen que codifica para la subunidad  $\alpha 7$  del receptor de acetilcolina en la epilepsia benigna Rolándica (6,9) y mutaciones en el gen que codifica para la subunidad  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> también involucrado en la epilepsia generalizada con crisis febriles y crisis de ausencia (6,12). Los pacientes con Síndrome de Down pueden presentar epilepsia en edad adulta que tiende a presentarse al mismo tiempo que la demencia. Cualquier enfermedad con un componente que cause daño cerebral puede producir epilepsia como la esclerosis tuberosa y neurofibromatosis (3).

Cómo una neurona o grupo de neuronas producen una sobreactividad y además se sincronizan y afectan a las neuronas vecinas es aún un misterio (5). Se

han desarrollado varias teorías que intentan explicar el mecanismo por el cual el cerebro es propenso a desarrollar descargas neuronales excesivas. Una de las primeras teorías y la más simple fue la pérdida del balance entre la excitación e inhibición en el cerebro resultando en la generación de crisis. En la actualidad se considera que las alteraciones en las redes corticales que generan oscilaciones de la actividad eléctrica, son reclutadas y transitan hacia la excitación dando lugar a la generación de las crisis epilépticas (1). Se ha observado que las neuronas piramidales (neuronas principalmente excitadoras) en condiciones normales no son capaces de excitar a las neuronas vecinas, sin embargo, al analizarse tejido extraído de focos epilépticos tal excitación si ocurre, lo que podría explicar el como se propaga el estímulo, no obstante no ha sido esclarecido el mecanismo por el cual ocurre este fenómeno (5).

## Clasificación clínica de las crisis epilépticas

La clasificación de las crisis epilépticas varía según autor o grupo de investigación, sin embargo, clínicamente se dividen en crisis parciales o focales y generalizadas. Las parciales a su vez se dividen en simples y complejas y las generalizadas en tónico-clónicas, ausencias, atónicas, tónicas, clónicas (2,4) (Figura 2). Las crisis pueden afectar las funciones motoras, autonómicas y sensoriales, el estado de conciencia, estado emocional, memoria, aprendizaje y comportamiento (1).

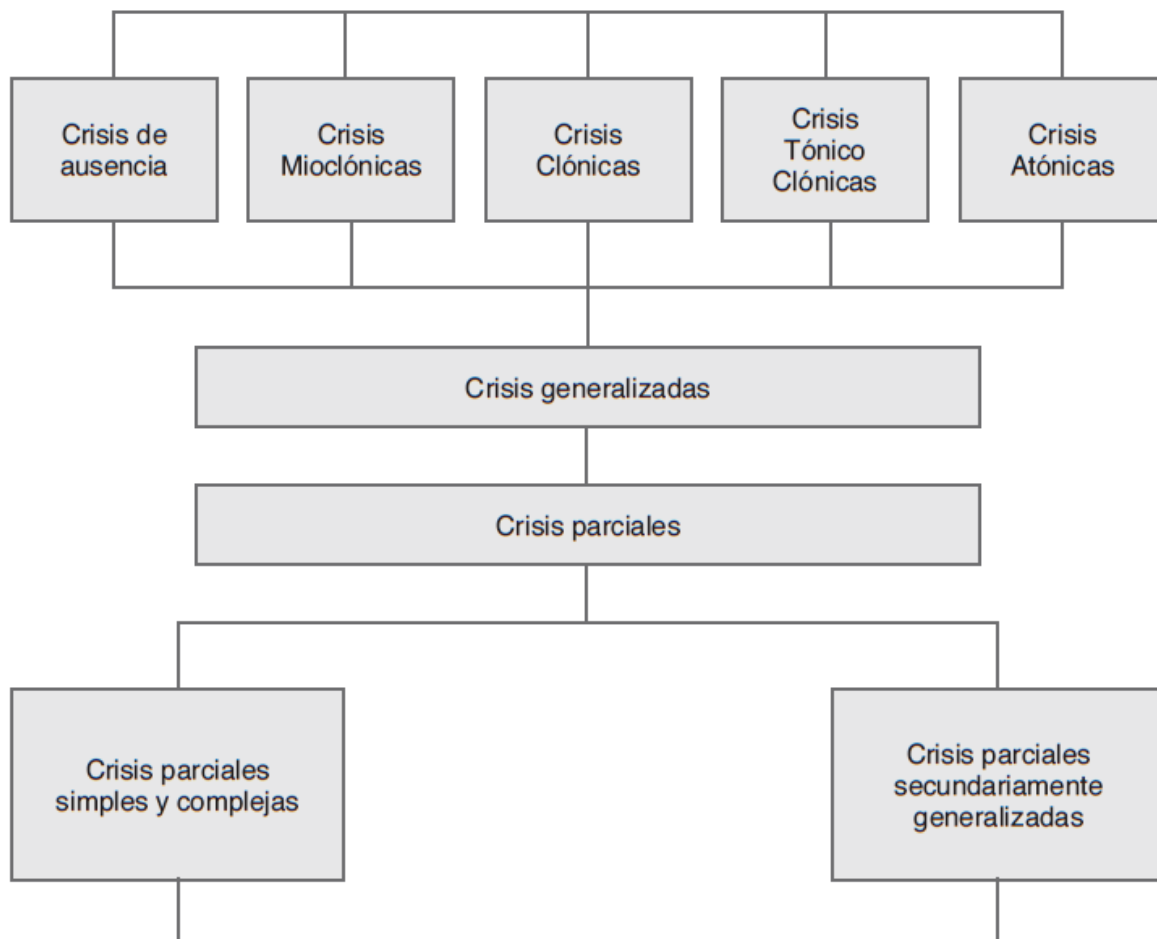


Figura 2. Clasificación de las crisis epilépticas. Tomada de cita 2.

Las crisis parciales o focales son aquellas que comienzan en un área específica y delimitada del cerebro denominado foco epiléptico, si la actividad epiléptica se esparce rápidamente a las neuronas vecinas puede inducir una crisis generalizada, a éstas se les llaman crisis parciales secundariamente

generalizadas. Las crisis parciales tanto simples como complejas pueden presentar manifestaciones sensoriales, que algunos autores denominan psíquicas, estos componentes son auditivos, visuales, olfatorios, gustatorios, sensaciones vestibulares, y posible distorsión de la percepción y manifestaciones motoras tónicas, clónicas o mioclonías, la diferencia entre ellas es la alteración en el estado de conciencia que se presenta en las complejas, no así en las simples, dependiendo de la zona donde se encuentre el foco epiléptico serán las manifestaciones clínicas (1,2,3,4). (Tabla 1).

| <b>Localización del foco epiléptico</b>              | <b>Signos y síntomas</b>   |
|--|--|
| <b>Lóbulo temporal anterior</b>                      | Masticación, chasquido de labios.  |
| <b>Lóbulo temporal anteromedial</b>                  | Comportamiento automático complejo.  |
| <b>Lóbulo Posterior</b>                              | Alucinaciones con imágenes formadas.   |
| <b>Corteza motora suplementaria y lóbulo frontal</b> | Contracciones musculares, sobre todo de brazos, sin pérdida de conocimiento, crisis nocturnas. |
| <b>Corteza sensorial y lóbulo parietal</b>           | Entumecimiento, hormigueo e incluso dolor.   |
| <b>Lóbulo occipital</b>                              | Alucinaciones visuales, puntos de colores y destellos de luz.                                  |

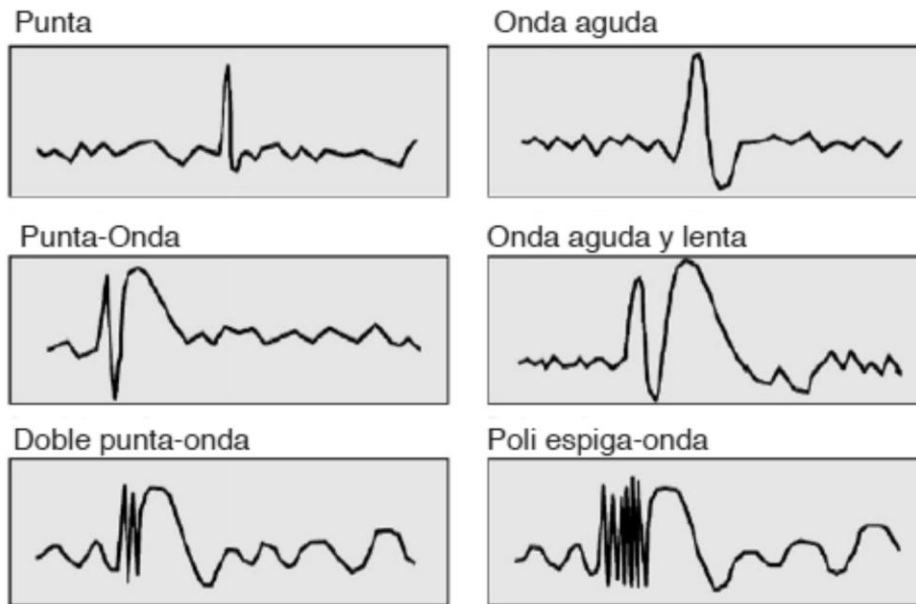
Tabla 1. Signos y síntomas de crisis parciales según el lóbulo donde tienen lugar. Adaptada de citas 2 y 3.

Las crisis generalizadas a diferencia de las focales involucran ambos hemisferios del cerebro y difunden por toda la corteza motora. Las dos crisis sobre las que recae mayor atención son las crisis de ausencia o *petit mal* las cuales constan de una pérdida abrupta de conciencia, el paciente puede permanecer de pie, con parpadeos rápidos y posible contracción del rostro,

para diferenciarla de las parciales complejas puede realizarse un electroencefalograma (EEG). El segundo tipo son las crisis tónico-clónicas generalizadas (CTCG) o *grand mal*, el paciente pierde la conciencia y comienza con una fase tónica, rigidez muscular que conlleva una caída y puede causar severas lesiones, seguida de una fase clónica, sacudidas rítmicas; durante la crisis el paciente puede morderse la lengua y sufrir de incontinencia urinaria y/o fecal, al término y recuperación de la crisis el paciente suele presentar confusión, posible agresión y cansancio (2,3).

## Epilepsia y electroencefalografía

Para que un paciente sea clínicamente diagnosticado como epiléptico se procede a un estudio electroencefalográfico. Permite confirmar si el paciente realmente sufre de crisis epilépticas y dado que cada crisis presenta distintos patrones, también puede usarse para confirmar el tipo de crisis que presenta, la zona donde comienza y que tan efectivo ha sido el tratamiento (13) (Tabla 2).



| <b>Patrón de EEG</b>                                     | <b>Síndrome epiléptico/ Etología</b> |
|--|--------------------------------------|
| <b>Espigas antero-temporales</b>                         | Epilepsia de lóbulo temporal mesial  |
| <b>Complejos punta-onda de 3 Hz</b>                      | Crisis de ausencia                   |
| <b>Complejos punta-onda mayores de 4 Hz, poliespigas</b> | Epilepsia mioclónica juvenil         |
| <b>Complejos de punta-ondas lentas</b>                   | Síndrome de Lennox-Gestaut           |
| <b>Poliespigas extratemporales</b>                       | Displasia focal cortical             |
| <b>Hipsarritmia</b>                                      | Síndrome de West                     |

Tabla 2. Distintos tipos de ondas, complejos de descargas interictales y patrones de EEG asociados a las crisis epilépticas. Adaptada de citas 2, 13.

El 30% de los pacientes pueden presentar un primer EEG interictal (entre crisis) normal, sin embargo, al aumentar el número de estudios este porcentaje disminuye; en estos casos puede recurrirse a un estímulo inductor como privación del sueño, hiperventilación o estimulación fónica para inducir la actividad epiléptica (2,13).

El electroencefalograma (EEG) es un registro de la actividad eléctrica de la corteza cerebral a través de electrodos colocados en el cuero cabelludo; mide los cambios eléctricos de potencial de las neuronas corticales en la superficie del cerebro, dicho cambio es de microvolts. Es muy difícil poder medir el cambio de una sola neurona por medio de un registro en el cuero cabelludo del paciente, sin embargo, el potencial generado por la suma de la actividad de un grupo de neuronas si es detectable (5).

Son tres los tipos de neuronas que se consideran el sustrato de la actividad eléctrica registrada por el electroencefalógrafo. Las células piramidales cuyos axones se proyectan desde la corteza cerebral a distintas zonas del cerebro hasta la médula espinal, son neuronas excitadoras cuyo principal neurotransmisor es el glutamato y se considera que este tipo de células son las que proveen la mayor parte del registro EEG. El segundo tipo son las interneuronas estrelladas cuyos axones se esparcen verticalmente en el plano de la columna cortical, obtienen sus potenciales de acción desde el tálamo y los transmiten a otras interneuronas o a las células piramidales. El tercer tipo son las células en cesto, son interneuronas inhibitorias cuyos axones están enroscados en su soma y su principal neurotransmisor es el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) (5).

## **Modelos experimentales de epilepsia**

El estudio de la epilepsia ha dependido del uso de modelos animales dadas las implicaciones éticas, los problemas de reproducibilidad y posibles efectos causados por la medicación de los pacientes; ha sido gracias a estos modelos que se han descubierto varias rutas fisiopatológicas que inducen las crisis epilépticas (14,15,19). Los roedores han sido los animales predilectos para la investigación, ya que tienen la ventaja de ser pequeños, de costos accesibles y disponibles en gran número, además de que han sido muy bien caracterizados fisiológicamente (16). Sin embargo, es de notar que estos modelos tienen limitaciones y en un sólo modelo no es posible simular todas las condiciones y características de las crisis y la información recabada por estos modelos debe de ser, siempre que sea posible, confirmada en tejido humano (14,16). Estos modelos pueden dividirse en dos grandes grupos diferenciando aquellas que inducen crisis parciales o generalizadas o bien como genéticos, electrofisiológicos, físicos o químicos (14,15,19) (Tabla 3).



| <b>Modelos animales de crisis epilépticas</b>            |
|--|
| <b>Crisis Parciales Simples</b>                          |
| Implantes metálicos corticales (Aluminio, cobalto, zinc) |
| <b>Crisis Parciales Complejas</b>                        |
| Ácido Kaínico  |
| Kindling   |
| Toxina tetánica  |
| <b>Crisis Tónico-Clónicas Generalizadas</b>              |
| Electrochoque máximo                                     |
| Pentilentetrazol   |
| Flutotil   |
| Penicilina   |
| GABA   |
| Bicuculina   |
| <b>Crisis Generalizadas de Ausencia</b>                  |
| Crisis audiogénicas en ratón                             |
| Babuinos <i>Papio papio</i> fotosensibles                |

Tabla 3. Modelos *in vivo* de epilepsia. Tomada de cita 19.

## **Pentilentetrazol**

El pentilentetrazol (PTZ), un derivado del tetrazol, es el agente convulsivante sistémico por excelencia usado en roedores, gatos y primates. Administrado por varias vías, dependiendo de la dosis, puede generar desde mioclonías hasta crisis tónico-clónica generalizadas (CTCG) (15,17,18,19). En 1972, se comenzó su uso para el modelo de *kindling* químico en roedores (15,18).

Se sabe que el PTZ actúa a nivel del receptor GABA<sub>A</sub> e incluso es considerado como un antagonista selectivo a este receptor que se une al sitio de unión de las benzodiazepinas (15,18,19). Anatómicamente el sitio donde inicia y se esparce principalmente la actividad epiléptica es el hipocampo y su efecto en roedores a los que se les administra de forma crónica produce cambios anatómicos aumentando el tamaño de los axones, incrementa el voltaje en los canales de potasio dependientes de voltaje, disminuye el efecto del GABA e influye en la expresión de los receptores a NMDA (19).

Aun cuando es utilizado para inducir CTCG en animales, es usado como modelo para probar fármacos con actividad contra crisis de ausencia, como la etosuccimida, dado que este fármaco fue capaz de bloquear el efecto del PTZ pero no bloqueo las crisis inducidas por electrochoque máximo, un modelo para probar fármacos con actividad contra CTCG (15,17,18,19).

## Glutamato y epilepsia

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el SNC. En 1954 Takashi Hayashi demostró que la aplicación tópica de soluciones de aminoácidos dicarboxílicos, en particular L-glutamato, en la corteza motora inducía actividad convulsiva (20,22). En 1970 a pesar de la evidencia de que el glutamato existía en grandes cantidades en el SNC y de su efecto excitador en las neuronas no era del todo aceptado que fuera el principal neurotransmisor excitador, por el daño que podía causar a las neuronas al haber una estimulación sostenida, se acuñó el término “excitotoxicidad”, un proceso necrótico o apoptótico por un exceso de entrada de calcio (23). Este fenómeno hizo suponer que algo tan nocivo para las neuronas no podía ser usado en la sinapsis (20). Fue en 1975 cuando fue descubierto el mecanismo por el cual el glutamato puede ser extraído del espacio sináptico hacia los astrocitos y ser convertido en glutamina, un compuesto sin efecto excitador que puede difundir pasivamente o por medio de un transportador hacia las neuronas glutamatérgicas donde vuelve a ser convertido en glutamato y compartimentalizado en vesículas para su posterior liberación (20,21) (Figura 3).

Actualmente se tiene evidencia de que la liberación excesiva de glutamato o la disminución del umbral de las neuronas al mismo son los precursores de varios procesos fisiopatológicos tales como demencia, epilepsia, Huntington y Parkinson, a su vez el glutamato se ha encontrado en grandes concentraciones después de eventos como isquemia y trauma cerebral por lo que se cree que está involucrado en excitotoxicidad aguda que ocurre inmediatamente a dichos eventos para volver a concentraciones normales después de un corto periodo (23,25).

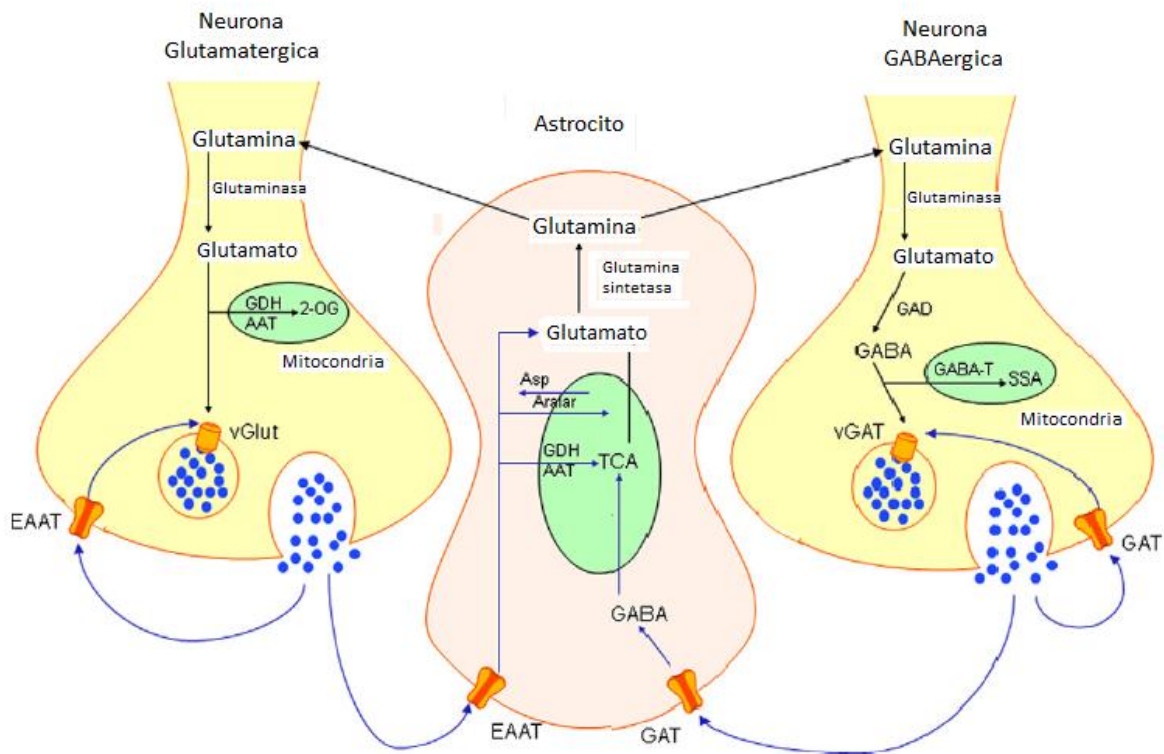


Figura 3. Síntesis, almacenamiento, liberación, transporte y metabolismo del glutamato y GABA. La glutaminasa convierte la glutamina en glutamato, el cual es convertido en GABA por la GAD en las neuronas GABAérgicas. Los neurotransmisores son almacenados en vesículas para su posterior liberación. Una vez liberados pueden ser internalizados hacia las neuronas o bien hacia los astrocitos para ser reciclados o metabolizados. 2-OG, oxoglutarato; AAT, aspartato aminotransferasa; Aralar, transportador glutamato-aspartato; Asp, aspartato; EAAT, transportador de aminoácidos; GABA-T, GABA transaminasa; GAD, ácido glutámico descarboxilasa; GAT, Transportador de GABA; GDH, glutamato deshidrogenasa; SSA, semialdehído succinico; TCA, ciclo del ácido tricarbóxico; vGAT, transportador vesicular de GABA; vGlut, transportador vesicular de glutamato. Adaptada de cita 21.

Dado el papel del glutamato como principal neurotransmisor excitador del SNC se ha aceptado que la sobreestimulación de la transmisión glutamatergica y por ende la activación de sus receptores pueden ser relevantes en las manifestaciones clínicas de la epilepsia (26,30). Por ejemplo, los impulsos glutamatergicos provenientes de la corteza entorrinal constituyen la principal fuente de excitación hacia el hipocampo y por ello una alteración en

estos impulsos puede estar involucrada en la patogénesis de las descargas epilépticas (26,31).

## Subtipos del receptor de glutamato

Los receptores ionotrópicos a glutamato son proteínas integrales membranales compuestos por cuatro subunidades que forman un canal iónico central (24,25) . Hay tres subtipos de receptores a glutamato nombrados según la afinidad a su agonista: NMDA, AMPA y Kainato (5,24,25) (Figura 4).

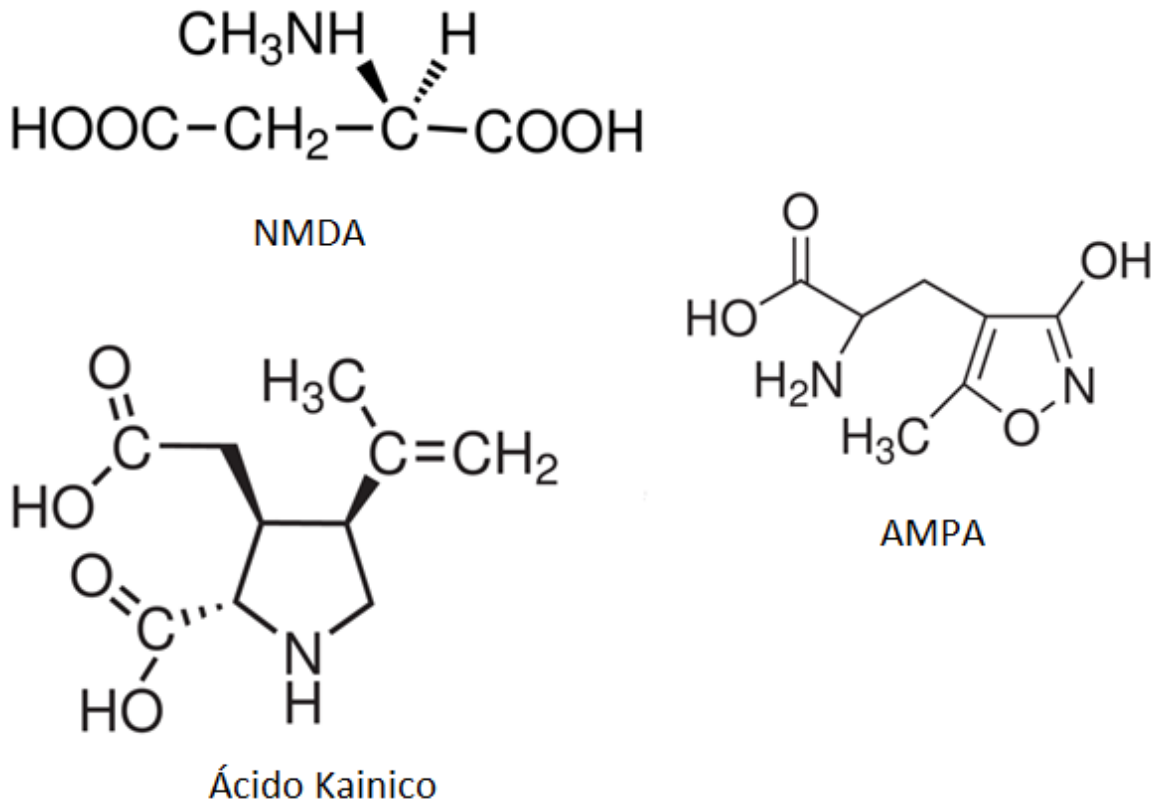


Figura 4. Estructuras de los agonistas a los receptores a glutamato.

Cada una de las subunidades que componen a los receptores cuentan con cuatro dominios semiautónomos: el dominio amino-terminal extracelular, el dominio extracelular de unión al ligando, el dominio transmembranal y el dominio carboxilo-terminal intracelular (Figura 5). Los receptores se ensamblan como tetrámeros, cada uno tiene distintas subunidades y pueden o no ensamblarse los receptores como isómeros o heterómeros. De los receptores AMPA se conocen cuatro subunidades, GluA1-GluA4, del NMDA siete subunidades, GluN1, GluN2A-GluN2D, GluN3A, GluN3B, del receptor a Kainato cinco subunidades, GluK1-GluK5; en el caso de los receptores AMPA pueden formarse isómeros o heterómeros funcionales, en el caso de los

receptores a Kainato solo GluK1-GluK3 pueden formar isómeros o heterómeros funcionales en tanto que GluK4 y GluK5 requieren forzosamente de otras subunidades para formar un receptor funcional, los receptores a NMDA requieren de dos subunidades GluN1, dos GluN2 (que no necesariamente deben de ser la misma y la población puede variar según la zona del cerebro) o bien una GluN2 y GluN3, la característica única de este receptor es un segundo sitio de unión a otro aminoácido, glicina, dicho sitio de unión se encuentra en la subunidades GluN1 y GluN3 en tanto que GluN2 tiene el sitio de unión a glutamato (24).

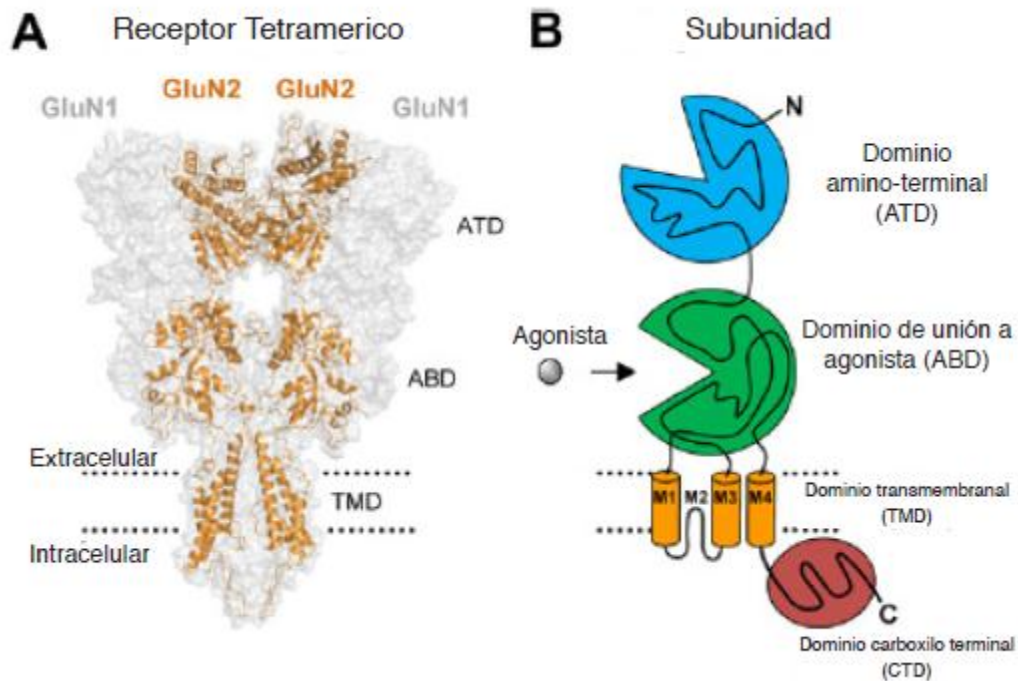


Figura 5. A) Modelo del receptor a NMDA basado en su estructura cristalizada, demostrando su estructura tetramérica formada por cuatro subunidades. B) Las subunidades del receptor a NMDA cuentan con cuatro dominios semiautónomos, el dominio extracelular amino terminal (ATD), el dominio bilobulado de unión a agonista (ABD), el dominio transmembranal (TMD) y el dominio intracelular caboxilo terminal (CTD). Adaptada de cita 27.

El poro de todos los receptores a glutamato esta formado por tres hélices transmembranales, siendo muy parecidos estructuralmente a los canales de potasio (24,32,33). Con la diferencia de que no tienen la misma

secuencia conservada de aminoácidos que los harían selectivos al  $K^+$ , sin embargo, estos receptores siguen siendo catión-selectivos, siendo el  $Ca^{2+}$  el catión de mayor importancia (24,34).

En el SNC de los mamíferos la mayor parte de la transmisión sináptica excitadora se lleva a cabo por medio de receptores AMPA, ya que son los que tienen una respuesta más rápida a la estimulación glutamatérgica, siendo los NMDA los que tienen una respuesta más lenta (24) (Figura 6). Estos dos receptores siempre se encuentran juntos y forman una unidad sináptica funcional, los receptores a AMPA son los primeros en responder al estímulo, sin embargo, son los NMDA los que sostienen la respuesta (24).

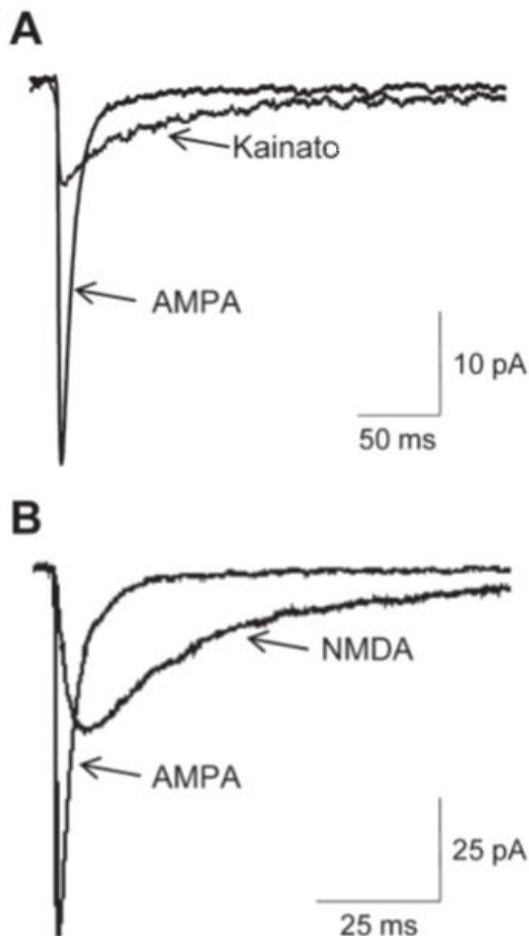


Figura 6. Contribución de los subtipos de receptor a glutamato en la actividad sináptica. A) Se muestra la contribución de los receptores a AMPA y Kainato en la actividad sináptica al ser bloqueados los receptores a NMDA mediante la aplicación de una solución 100  $\mu$ M de AP-5; la corriente postsináptica mediada por el receptor a AMPA es más rápida que la mediada por el receptor a Kainato, sin embargo, la actividad mediada por este receptor es de mayor duración. B) Contribución a la respuesta sináptica de los receptores a NMDA y AMPA, la actividad del receptor a NMDA es más lenta y el tiempo de duración es mucho mayor que el del receptor a AMPA y Kainato. Tomada de cita 24.

Los receptores a kainato por su parte tienen importancia tanto en los sitios pre- y postsinápticos, durante la gestación estos receptores son los más



importantes en la transmisión sináptica tálamo-cortical, sin embargo, en las primeras semanas posteriores al nacimiento estos receptores son sustituidos por AMPA, lo cual ayuda a disminuir el tiempo de respuesta entre los circuitos neuronales (24,35) (Tabla 4). Su rol principal es el de amplificar la integración y transmisión sináptica (24,36,37).

| Subunidad | Localización e importancia  |
|-----------|---|
| GluN2A    | Corteza, hipocampo y cerebelo. Sustituyen a la subunidad GluN2B en las primeras semanas postnatales, tienen una respuesta mas rápida a la estimulación                          |
| GluN2B    | Corteza, hipocampo y cerebelo, forma parte de los circuitos neuronales durante la gestación   |
| GluN2C    | Células musgosas y granuladas del cerebelo  |
| GluN2D    | Diencéfalo, tallo cerebral y cerebelo. Es más común en las primeras semanas postnatales.  |
| GluN3A    | Tallo cerebral y médula espinal. Se encuentra principalmente en las primeras semanas postnatales y es primordial para la sinaptogénesis y en la formación de la médula espinal. |
| GluN3B    | Tallo cerebral y médula espinal. Se presenta en personas adultas y participa en la maduración y plasticidad sinápticas.   |

Tabla 4. Distribución de las subunidades del receptor a NMDA

## El receptor a NMDA

El receptor a NMDA (Figura 8) está involucrado en el desarrollo neuronal, plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria, pero también en una gran serie de condiciones patológicas incluyendo el dolor neuropático, epilepsia, enfermedades neurodegenerativas y trastornos psiquiátricos (24,27,29).

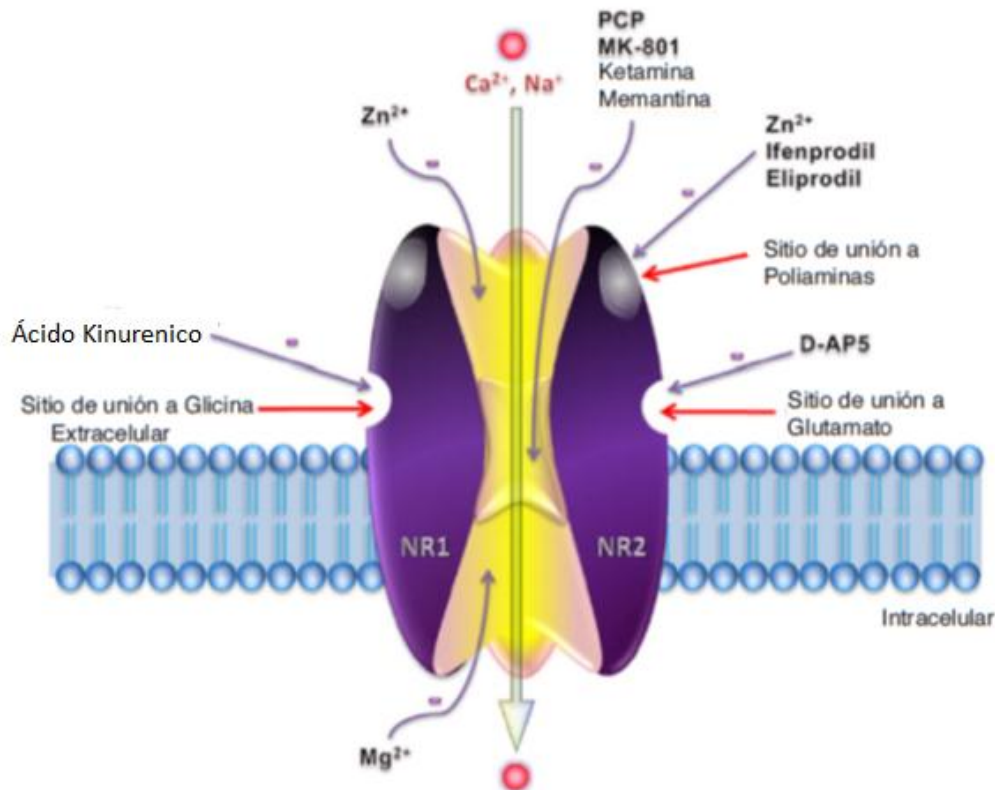


Fig 8. Modelo del receptor a NMDA. Se muestran los sitios de unión de agonistas y antagonistas. Glicina y D-serina se unen en la subunidad GluN1, mientras que glutamato y NMDA en la subunidad GluN2. El ácido kinurénico es un ligando endógeno para GluN1. Zn<sup>2+</sup> es un ligando endógeno para los dominios amino terminales de las subunidades GluN2A y GluN2B. En concentraciones nanomolares el Zn<sup>2+</sup> tiene afinidad hacia GluN2A, a concentraciones micromolares tiene afinidad hacia GluN2B. A altas concentraciones el Zn<sup>2+</sup> puede actuar como un bloqueador del canal iónico. El ifendropil y sus derivados se unen al dominio amino terminal de forma selectiva a GluN2B. D-AP5 es un antagonista al sitio de unión a glutamato en GluN2. Mg<sup>2+</sup>, MK-801, Ketamina, Fenciclidina (PCP) y memantina actúan como antagonistas no competitivos cuyos sitios de unión se encuentran en el poro. Tomada de cita 26.

Nuestro conocimiento sobre este receptor, su papel como mediador de la neurotransmisión excitadora y en la plasticidad sináptica ha sido gracias a los agonistas y antagonistas específicos que permitieron diferenciar su actividad de los receptores a AMPA y Kainato, estas herramientas farmacológicas han ayudado a confirmar la hipótesis de que este receptor juega un papel muy importante en una gran serie de padecimientos neurológicos como la epilepsia (28).

Los receptores a glutamato son permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo precisamente la entrada de este catión lo que desencadena otros factores involucrados en la plasticidad sináptica, regulación génica y neuropatologías (24,25,38-41). Sin embargo, hay una diferencia importante en cuanto a la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ , los receptores a NMDA son 3-4 veces mas permeables que los AMPA y Kainato, y esta permeabilidad se ve afectada de acuerdo al tipo de subunidad GluN2 que tengan, en el caso de aquellos que tengan una subunidad GluN3 la permeabilidad se ve reducida (24).

Todos los receptores a glutamato sufren de una desensibilización, la cual es una reducción a la respuesta causada por un estímulo sostenido (Figura 7). Sin embargo, son los receptores a NMDA los que presentan una desensibilización más lenta, y está virtualmente ausente en aquellos receptores que contienen las subunidades GluN2C y GluN2D (24,42). Aunque este efecto es causado principalmente por la sobreestimulación del glutamato también se han visto otras rutas tales como la dependiente de glicina, calcio, zinc, glicina/calcio. Sin embargo, los mecanismos moleculares para estas formas de desensibilización aun no se comprenden del todo (24,43,44).

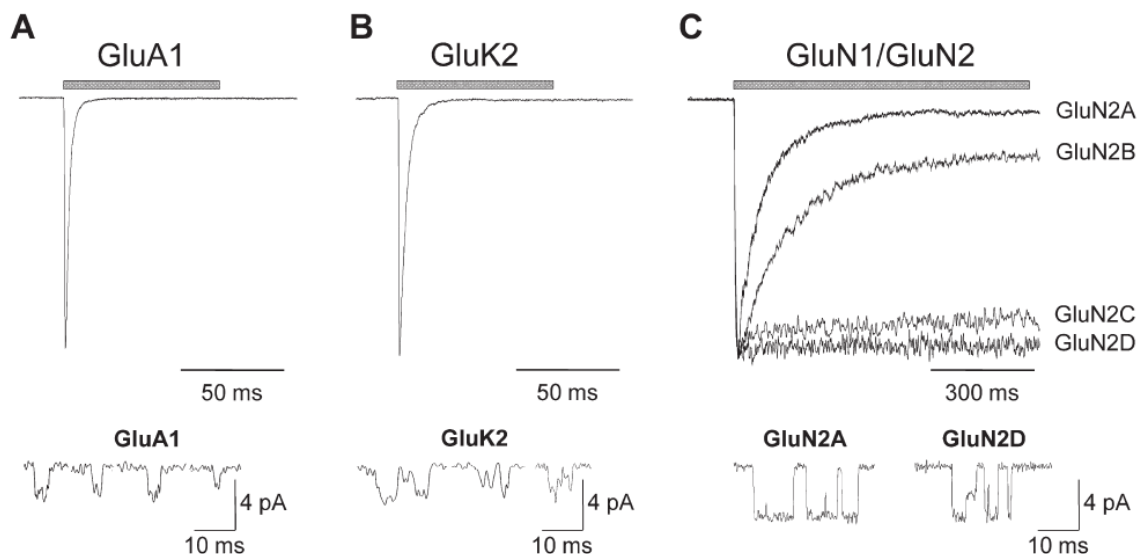


Figura 7. Receptores AMPA (A) y Kainato (B) activados por L-glutamato presentaron una pronunciada y rápida desensibilización que ocurre milisegundos después de la activación, resultando en una corriente estable de menos del 5% del pico de respuesta. Los receptores a NMDA (C) fueron activados por saturación de L-glutamato y glicina por 1 segundo. El grado y tiempo de desensibilización es dependiente de la subunidad. Aquellos que contienen la subunidad GluN2A se desensibilizan rápidamente, GluN2B es más lento, mientras que en GluN2C y GluN2D no presentan desensibilización. Tomada de cita 24.

Como antes se mencionó la liberación excesiva de glutamato puede producir un efecto llamado excitotoxicidad, la cual se define como una exposición excesiva al neurotransmisor o bien la sobreestimulación del receptor desencadenando daño o muerte neuronal, los receptores a NMDA son los que se han visto implicados en este efecto, la causa es la entrada excesiva de calcio, acumulándose y activando procesos que favorecen la formación de radicales libres y activando rutas enzimáticas que pueden producir la muerte celular (29,45). Se han desarrollado varios compuestos para bloquear el receptor a glutamato o glicina o el canal iónico (23,24). Desafortunadamente, casi todos los compuestos usados para bloquear al sitio de unión del glutamato o el canal iónico no han tenido buenos resultados en las pruebas clínicas por sus efectos adversos como alteración de la función cardiovascular, pérdida de la conciencia, alteración del aprendizaje (23,24). Actualmente se tiene evidencia que la inhibición de los receptores a NMDA pueden impedir la recuperación de las neuronas dañadas pero aun vivas durante un proceso

isquémico, lo que pone en tela de juicio la hipótesis de que el simple bloqueo del receptor es suficiente para ayudar a la recuperación del paciente, por lo cual se buscan alternativas como inhibir la sobre-activación de los receptores a AMPA y kainato (24,46).

## MK-801

Maleato de (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d] cicloheptan-5,10-imina (MK-801) o Dizolcipina (Figura 9) es un potente antagonista no-competitivo del receptor a NMDA el cual entra al canal iónico y bloquea el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la neurona, de hecho es tan potente que incluso puede quedarse dentro del canal una vez que este se cierra y necesita de una segunda estimulación que abra el canal para que se libere el MK-801, siendo esta la causa de sus efectos adversos (24,26,29,55). Su unión es más fuerte hacia los receptores con subunidades GluN2A y GluN2B (24,56). Se ha reportado que tiene actividad anticonvulsivante en varios modelos animales como NMDA, ácido quinolínico, bicuculina, PTZ, cámara hiperbárica de oxígeno y crisis tónico clónicas generalizadas en ratones E1 (26,57,58,59).

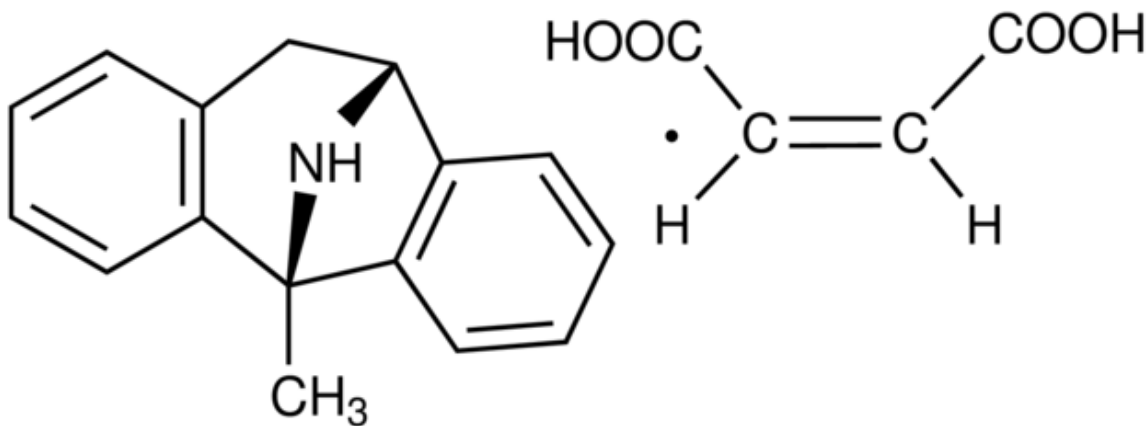


Figura 9. Estructura química del MK-801

Los primeros estudios en humanos fueron prometedores al usarse en tratamientos combinados con otros antiepilépticos como pentobarbital, valproato y nicardipina mostrando hasta una reducción del 50% en las crisis epilépticas; sin embargo, estos resultados tan alentadores se vieron opacados debido a que el MK-801, aun en dosis subterapéuticas, en tratamientos prolongados causaba varios efectos adversos (26), el peor de ellos el coma (29), un efecto adverso clínicamente inadmisibles. Dada su gran afinidad al receptor a NMDA se sigue utilizando en modelos animales de enfermedades neurológicas (29,48,49,50).

## AP-5

En 1981 el ácido (R)-2-amino-5-fosfonopentanoico (AP-5) o ácido (R)-2-amino-5-fosfonovalérico (APV) (Figura 10) fue identificado como un antagonista selectivo del receptor a NMDA lo cual permitió diferenciar la actividad mediada por NMDA sobre la de los receptores a AMPA y Kainato (20,22,24).

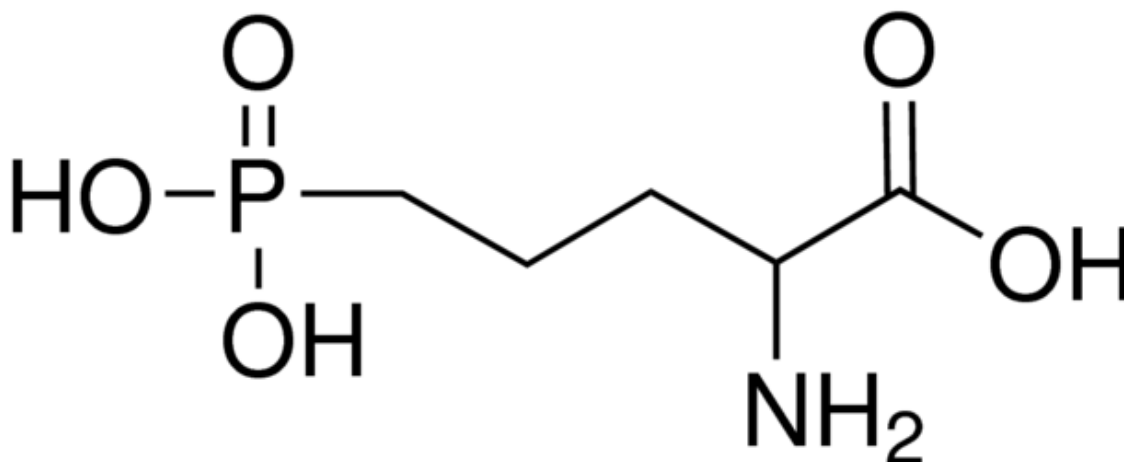


Figura 10. Estructura química del AP-5

Se ha demostrado que su administración tanto sistémica como tópica disminuye las crisis epilépticas. Cuando el AP-5 se administra directamente sobre focos epilépticos inducidos por cobalto disminuye la hiperactividad electrográfica y bloquea la actividad motora de la crisis, mioclonías, (51,54) mientras que en rebanadas de hipocampo de ratas *kindleadas* inhibió los potenciales excitatorios post-sinápticos (51,52). En ratones E1 la administración intraventricular de 30 nmoles de AP-5 (51,53) y de 1.8 micromoles intraperitoneal inhibió las crisis epilépticas y disminuyó la concentración de glutamato en el cerebro (53). En otro estudio con ratas *kindleadas* mediante estimulación eléctrica de la amígdala se les administraron 70 nmol de AP-5 en la corteza peririnal que produjeron la inhibición del 80% de la conducta convulsiva (73). En un estudio utilizando rebanadas de corteza peririnal e hipocampo de rata y una solución 50  $\mu$ M de AP-5 en conjunto con fenitoína y felbamato se logró potenciar el efecto de la fenitoína, no así del felbamato, en dicho estudio se buscaba dilucidar si alguno de estos fármacos tenía efecto sobre los receptores a NMDA demostrándose que el felbamato si

tiene efecto sobre dichos receptores al no haber un cambio significativo al ser administrado conjuntamente con el AP-5 (74).

Al realizarse una microinyección de AP-5 en la sustancia gris periacueductal, en un modelo de inducción de dolor mediante agonistas de los receptores a glutamato, se determinó que este antagonista reduce el comportamiento similar al dolor de forma dosis-dependiente mediante la inhibición de los receptores a NMDA en dicha estructura del tallo cerebral (72).



## FORMACIÓN RETICULAR BULBAR Y NÚCLEO GIGANTOCELULAR

Anatómicamente la formación reticular se define como un grupo indiferenciado de células localizadas en el centro del tallo cerebral, se le divide en tres zonas: 1) una región pequeña en la línea media formada principalmente por los núcleos de Rafe, 2) un campo tegmental medial grande con fibras largas ascendentes y descendentes provenientes de núcleos anteriores 3) un campo tegmental lateral grande, considerado un campo sensorial debido a las muchas proyecciones sensoriales que recibe además de proyecciones hacia los núcleos craneales motores. Es en el campo tegmental medial donde se encuentran neuronas de gran tamaño (gigantes) en el bulbo rostral, los núcleos gigantocelulares (61).

El núcleo gigantocelular (NGi), forma parte de la formación reticular del tallo cerebral, se le involucra en los procesos de locomoción de extremidades superiores e inferiores, en la regulación de la presión arterial, movimientos oculares, del cuello y la postura (62,64,65); en monos Rhesus al ser estimulado eléctricamente provoca movimientos de orejas, rostro, la parte superior del torso, y contracción de los músculos del cuello, la estimulación de la parte dorsal del núcleo induce movimientos rotatorios ipsilaterales de la cabeza (64). Se ha estudiado principalmente su importancia fisiológica en procesos cardiovasculares y regulación de nocicepción (62).

El NGi recibe estímulos de varias zonas del cerebro, del colículo superior, núcleo arcuato y núcleo raphe obscurus (63). Las neuronas reticulares bulbares reciben aferencias cutáneas, corticales y tectales, estas se organizan somatotópicamente y de ellas surgen las fibras descendentes del tracto reticuloespinal ventrolateral ipsilateral que se extiende hasta la medula espinal lumbar. Se determinó que las neuronas reticulares bulbares como componentes del sistema descendente medial, junto con el vestíbulo-espinal, el tecto-espinal y el intersticio-espinal controlan a las neuronas motoras de la musculatura axial y los músculos de las extremidades proximales (69,70). En un estudio, utilizando rebanadas *in vitro* de tallo cerebral de un cerebro aislado de roedor con amarillo de lucifer y registros intracelulares se identificaron electrofisiológicamente dos

tipos de neuronas gigantocelulares: el primer tipo se caracteriza por una hiperpolarización persistente y una descarga regular espontánea; el segundo tipo por una hiperpolarización bifásica con un componente rápido y uno retardado que usualmente presentan descargas espontáneas irregulares (69,71). Las neuronas presentan características únicas en sus membranas como un bajo potencial transmembranal, altas resistencias de entrada de la membrana y altos potenciales de despolarización transmembranal (62). A la fecha no se ha estudiado su posible participación en el inicio y la propagación de las crisis epilépticas.

## OBJETIVOS

- a) Valorar el efecto del AP-5, aplicado en el NGi de la rata, sobre las crisis provocadas por PTZ.
- b) Estudiar el efecto del MK-801, aplicado en el NGi de la rata, sobre las crisis provocadas por PTZ.
- c) Determinar si los antagonistas del receptor a NMDA en el NGi están relacionados con la regulación de las crisis epilépticas.

## PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso 250-270 g, 8 por cada grupo. Se anestesiaron con Ketamina (PiSA Agropecuaria, S.A. de C.V. México) (80 mg/Kg) y Xilazina (PiSA Agropecuaria, S.A. de C.V. México) (10 mg/Kg) i.p. Se colocaron en un aparato estereotáxico (Stoelting, Co. EUA). Se practicó una incisión a lo largo del cráneo, separando la piel y tejido conectivo para dejar descubierta la zona. Se colocaron dos tornillos de acero inoxidable, una cánula guía calibre 25 de acero inoxidable dirigida estereotáxicamente hacia el NGi con las siguientes coordenadas AP: -10.8 mm a partir de Bregma, L: 0.8mm, V: 9.4mm (Paxinos y Watson, 1998). Se colocaron 3 electrodos de acero inoxidable, los dos primeros para el registro EEG de la corteza motora y el tercero como referencia. Los electrodos se soldaron a un conector hembra de tres polos y estos juntos con la cánula guía se fijaron al cráneo con acrílico dental (Arias, SA. México). Se mantuvieron a los animales en jaulas de acrílico por siete días para su recuperación con agua y alimento *ad libitum*.

Se realizó un registro del EEG normal con el animal despierto y en libre movimiento mediante un conector macho de tres polos con un polígrafo Grass modelo 78D. Después, con una cánula calibre 32 unida con un tubo de polietileno a una microjeringa de 10  $\mu$ L, se realizó la microinyección del vehículo al grupo control (solución salina 0.9% amortiguada pH 7.4), AP-5 (10, 20 nmol) o MK-801 (6, 12 nmol) todas en un volumen de 0.2  $\mu$ L. Se registró la actividad electroencefalográfica y conductual durante 30 minutos. Al término de este tiempo se les inyectó PTZ a una dosis de 70 mg/kg i.p. y se registró el EEG, y la conducta epiléptica durante 90 minutos. Una vez terminada la fase experimental los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico (Pet's Pharma de México S.A. de C.V. México) y se les realizó una microinyección de 0.2  $\mu$ L de azul de metileno. Por último se les practicó una perfusión cardiaca con solución salina y heparina seguida del paso de solución de formaldehído al 3.7%, se extrajo el cerebro y realizaron cortes de 80 micras en un microtomo de congelación para la corroboración del sitio de microinyección.

Se valoró la latencia a la primera crisis generalizada tónico-clónica (CTCG) y los porcentajes de retardo y de supresión de las CTCG. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con la prueba exacta de Fisher y t de Student entre el grupo control y los experimentales. Se tomaron como significativos los datos cuya P fue menor a 0.05.

Todos los animales utilizados fueron tratados de acuerdo a las normas establecidas por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio y a las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999, de Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

## RESULTADOS

### Valoración Conductual

El grupo control, al que solo se le administró solución salina amortiguada (PBS), no presentó cambios de conducta posterior a la microinyección. Posterior a la administración de PTZ, todos los animales presentaron CTCG y murieron. El tiempo de latencia promedio a la primer CTCG fue de  $2.70 \pm 1.04$  minutos.

Grupos AP-5: Se les administró AP-5 (10 y 20 nmol) y presentaron giro contralateral durante los 30 minutos posteriores a la microinyección. Tras la administración del PTZ. El grupo al que se le administró 10 nmol: 5 de los 8 animales (62.5%) no presentaron CTCG (Tabla 5), 2 de los animales que si presentaron CTCG murieron (25%) (Tabla 6). El tiempo de latencia promedio a la primer CTCG fue de  $60.46 \pm 14.43$  minutos (Tabla 7), estos resultados son significativos con respecto al grupo control ( $P < 0.05$ ). Con 20 nmol, además de presentar el giro contralateral, 25% de los animales presentaron giro de barril. Tras la administración del PTZ, 6 de los 8 animales (75%) no presentaron CTCG (Tabla 5) y los dos animales que si presentaron CTCG murieron (Tabla 6). El tiempo de latencia promedio fue de  $68.97 \pm 13.77$  minutos (Tabla 7), estos resultados son significativos con respecto al grupo control ( $P < 0.05$ ).

TABLA 5

Porcentaje de protección de CTCG

| Tratamiento | # Animales con CTCG | % Protección | P       |
|-------------|---------------------|--------------|---------|
| Vehículo    | 8/8                 | 0            | -       |
| AP-5        |                     |              |         |
| 10 nmol     | 3/8                 | 62.5         | 0.0310* |
| 20 nmol     | 2/8                 | 75           | 0.0097* |

Efecto del AP-5 microinyectado en el NGi sobre las CTCG inducidas por PTZ. Todos los compuestos fueron microinyectados en un volumen de 0.2 µL en el NGi de la rata.

\*p<0.05 comparada con el grupo control (Prueba exacta de Fisher).

TABLA 6

Porcentaje de sobrevivencia a la CTCG

| Tratamiento | # Animales que sobrevivieron | % Sobrevivencia | P       |
|-------------|------------------------------|-----------------|---------|
| Vehículo    | 0/8                          | 0               | -       |
| AP-5        |                              |                 |         |
| 10 nmol     | 6/8                          | 75              | 0.0097* |
| 20 nmol     | 6/8                          | 75              | 0.0097* |

Efecto del AP-5 microinyectado en el NGi sobre la sobrevivencia a las CTCG inducidas por PTZ. Todos los compuestos fueron microinyectados en un volumen de 0.2 µL en el NGi de la rata.

\*p<0.05 comparada con el grupo control (Prueba exacta de Fisher).

TABLA 7  
Latencia promedio a la 1er CTCG

| Tratamiento | Latencia a la 1er CTCG<br>(min)<br>$\bar{x} \pm E.E.$ | t       |
|-------------|---|---------|
| Vehículo    | 2.70 ± 1.04   | -       |
| AP-5        |   |         |
| 10 nmol     | 60.46 ± 14.43   | -3.422* |
| 20 nmol     | 68.97 ± 13.77   | -3.361* |

Efecto del AP-5 microinyectado en el NGi sobre la latencia a la primer CTCG inducida por PTZ. Todos los compuestos fueron microinyectados en un volumen de 0.2 µL en el NGi de la rata.

\*p<0.05 comparada con el grupo control (t de Student).



La microinyección de MK-801 provocó sedación durante los 30 minutos posteriores a la microinyección, a diferencia de los grupos administrados con AP-5 no presentaron giro contralateral, ni giro de barril. En el grupo al que se le microinyectaron 6 nmol, después de la administración del PTZ: 5 de los 8 animales (62.5%) no presentaron CTCG (Tabla 8), los 3 animales que si presentaron CTCG murieron (Tabla 9). El tiempo de latencia promedio a la primer CTCG fue de  $57.82 \pm 15.70$  minutos (Tabla 10), solo los resultados de protección contra las CTCG y de sobrevivencia fueron significativos ( $P < 0.05$ ). En el grupo al que se le microinyectaron 12 nmol, después de la administración del PTZ: 6 de los 8 animales (75%) no presentaron CTCG (Tabla 8), los dos animales que si presentaron CTCG murieron (Tabla 9). El tiempo de latencia promedio a la primer CTCG fue de  $69.64 \pm 13.33$  minutos (Tabla 10), estos resultados son significativos con respecto al grupo control ( $P < 0.05$ ).

TABLA 8

Porcentaje de protección de CTCG

| Tratamiento | # Animales con CTCG | % Protección | P       |
|-------------|---------------------|--------------|---------|
| Vehículo    | 8/8                 | 0            | -       |
| MK-801      |                     |              |         |
| 6 nmol      | 3/8                 | 62.5         | 0.0310* |
| 12 nmol     | 2/8                 | 75           | 0.0097* |

Efecto del MK-801 microinyectado en el NGi sobre las CTCG inducidas por PTZ. Todos los compuestos fueron microinyectados en un volumen de 0.2  $\mu$ L en el NGi de la rata.

\* $p < 0.05$  comparada con el grupo control (Prueba exacta de Fisher).

TABLA 9

Porcentaje de sobrevivencia a la CTCG

| Tratamiento | # Animales que sobrevivieron | % Sobrevivencia | P       |
|-------------|------------------------------|-----------------|---------|
| Vehículo    | 0/8                          | 0               | -       |
| MK-801      |                              |                 |         |
| 6 nmol      | 5/8                          | 62.5            | 0.0310* |
| 12 nmol     | 6/8                          | 75              | 0.0097* |

Efecto del MK-801 microinyectado en el NGi sobre la sobrevivencia a las CTCG inducidas por PTZ. Todos los compuestos fueron microinyectados en un volumen de 0.2  $\mu$ L en el NGi de la rata.

\*p<0.05 comparada con el grupo control (Prueba exacta de Fisher).

TABLA 10

Latencia promedio a la 1er CTCG

| Tratamiento | Latencia a la 1er CTCG (min)<br>$\bar{x} \pm E.E.$ | t       |
|-------------|--|---------|
| Vehículo    | 2.70 $\pm$ 1.04                                    | -       |
| MK-801      |  |         |
| 6 nmol      | 57.82 $\pm$ 15.70                                  | -2.373  |
| 12 nmol     | 69.64 $\pm$ 13.33                                  | -3.547* |

Efecto del MK-801 microinyectado en el NGi sobre la latencia a la primer CTCG inducida por PTZ. Todos los compuestos fueron microinyectados en un volumen de 0.2  $\mu$ L en el NGi de la rata.

\*p<0.05 comparada con el grupo control (t de Student).

La microinyección de 10 nmol de AP-5 en los núcleos dorsal paragigantocelular (DPGi), núcleo intermedio reticular (IRt), núcleos adyacentes al NGi, produjeron también giro contralateral además de inhibir las CTCG (Figura 11).

La microinyección de 12 nmol de MK-801 en el núcleo lateral paragigantocelular (LPGi), además de producir sedación, inhibió las CTCG (Figura 12).

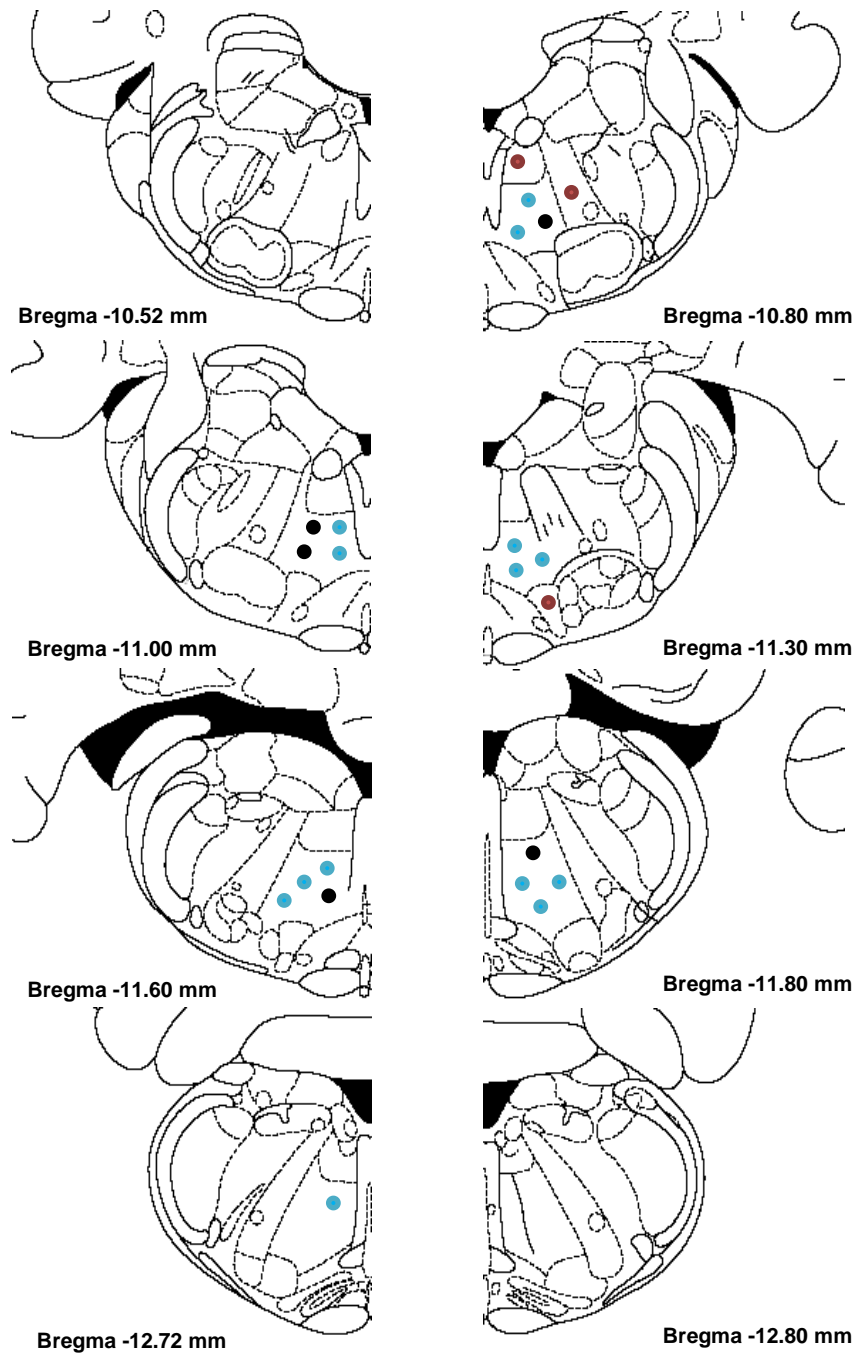


Figura 11. Esquema de los sitios de microinyección de AP-5 en el núcleo gigantocelular de la rata según el atlas de Paxinos y Watson. Los círculos azules muestran los sitios donde hubo inhibición de las CTGG, los círculos negros donde no hubo inhibición. Los círculos café microinyecciones fuera del NGi donde también hubo inhibición a las CTGG.

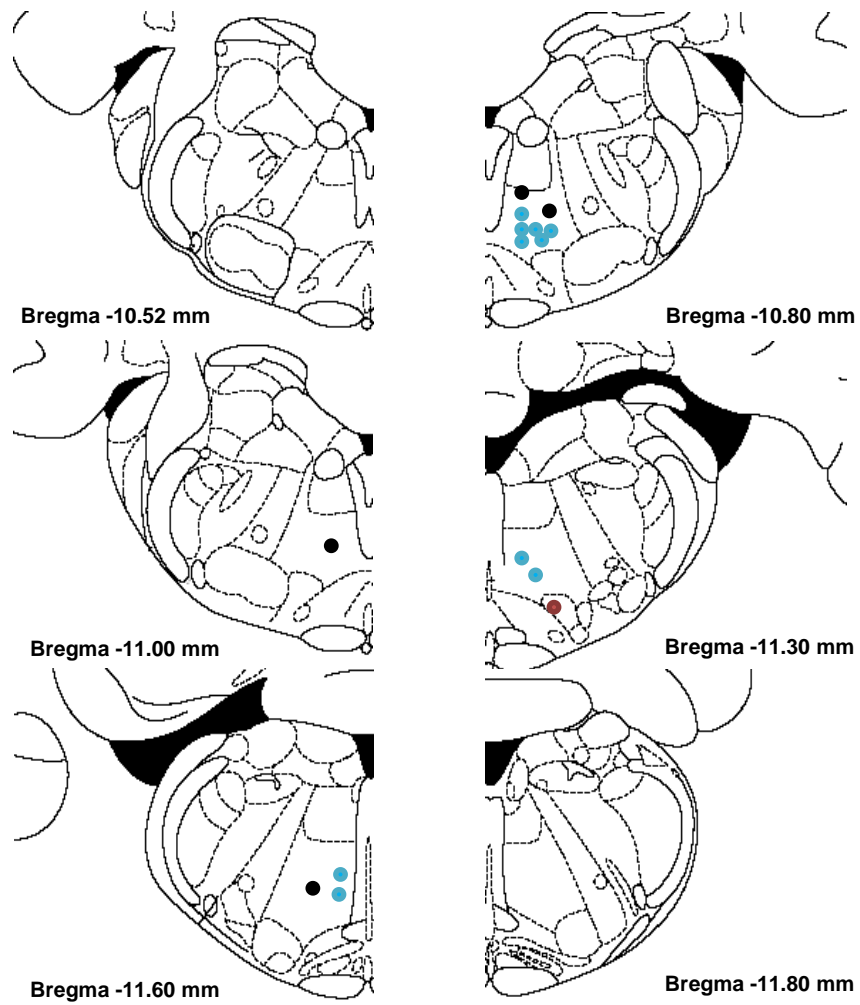


Figura 12. Esquema de los sitios de microinyección de MK-801 en el núcleo gigantocelular de la rata según el atlas de Paxinos y Watson. Los círculos azules muestran los sitios donde hubo inhibición de las CTG, los círculos negros donde no hubo inhibición. El círculo café una microinyección fuera del NGi donde también hubo inhibición a las CTG. A Diferencia de los sitios de microinyección de AP-5 estos no estuvieron tan dispersos a lo largo del núcleo.

## Valoración electroencefalográfica

En el grupo control se realizó una microinyección unilateral de 0.2  $\mu$ L de solución salina amortiguada (PBS). Al inicio del registro los animales se encontraban alerta, en libre movimiento, después de la administración del vehículo, no hay cambio en el registro electroencefalográfico. Tras la administración del PTZ se presentó una actividad electroencefalográfica de gran amplitud, aproximadamente 2 mV, frecuencia y duración asociada conductualmente con CTCG con extensión de miembros anteriores y posteriores (Figura 13).

En los grupos administrados con AP-5, los animales se encontraban alertas y en libre movimiento, tras la microinyección de 0.2 $\mu$ L de AP-5 no se apreció cambio alguno en el registro, ni durante el giro contralateral o de barril. Al administrarse el PTZ se observó una actividad de gran amplitud, aproximadamente 1.25 mV, y duración, sin embargo, es menor a la del grupo de PBS (Figura 14).

En los grupos administrados con MK-801, los animales se encontraban alertas y en libre movimiento, tras la microinyección de 0.2 $\mu$ L de MK-801 no se apreció cambio alguno en el registro, ni al observarse el efecto de sedación. Con la administración del PTZ se observaron postdescargas pequeñas de baja amplitud, aproximadamente 1.5 mV, y corta duración, aproximadamente dos segundos, asociadas a mioclonías faciales y mioclonías de miembros anteriores (Figura15).

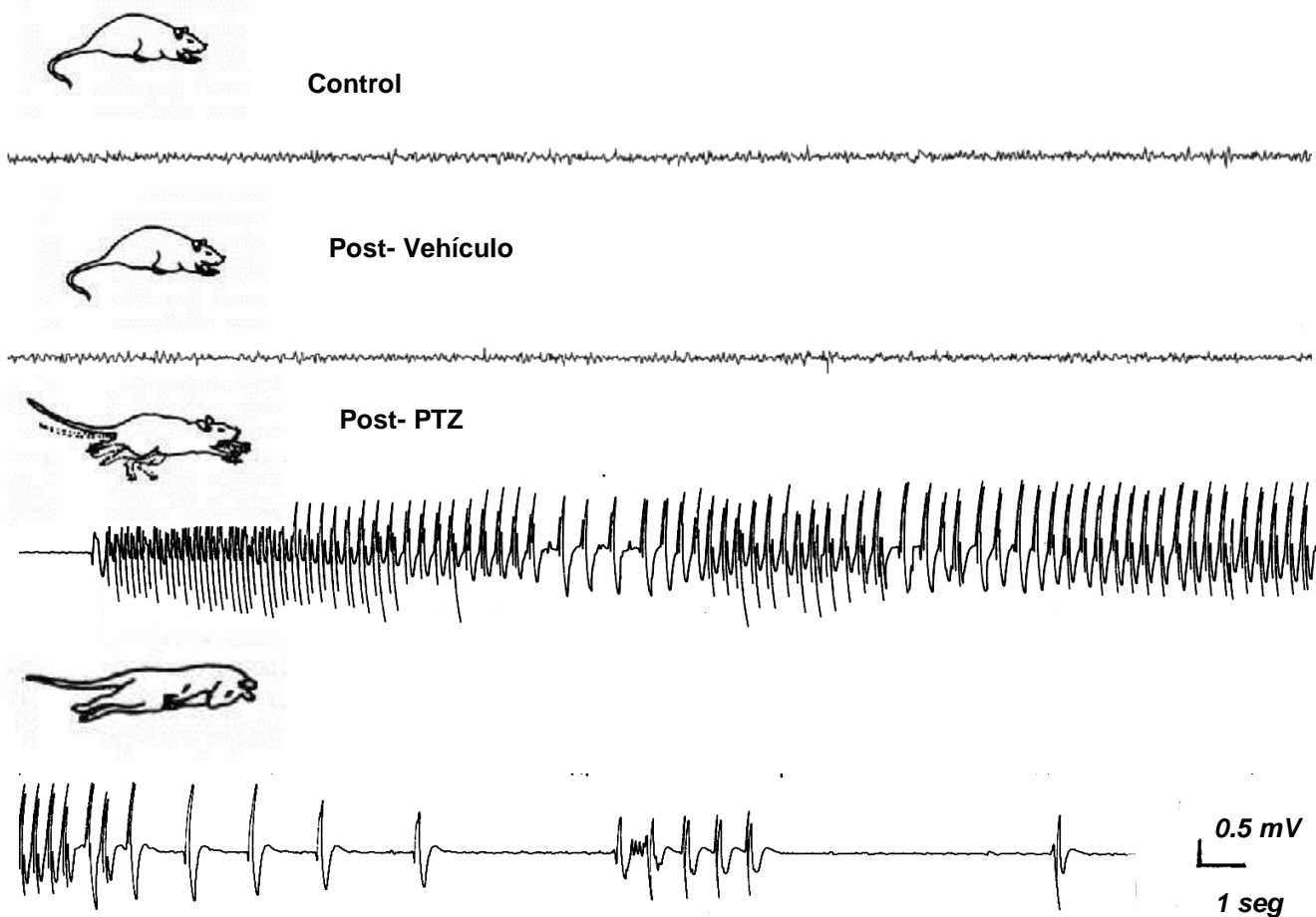


Figura 13. Ejemplo de la actividad electroencefalográfica registrada en la corteza motora de las ratas del grupo control.

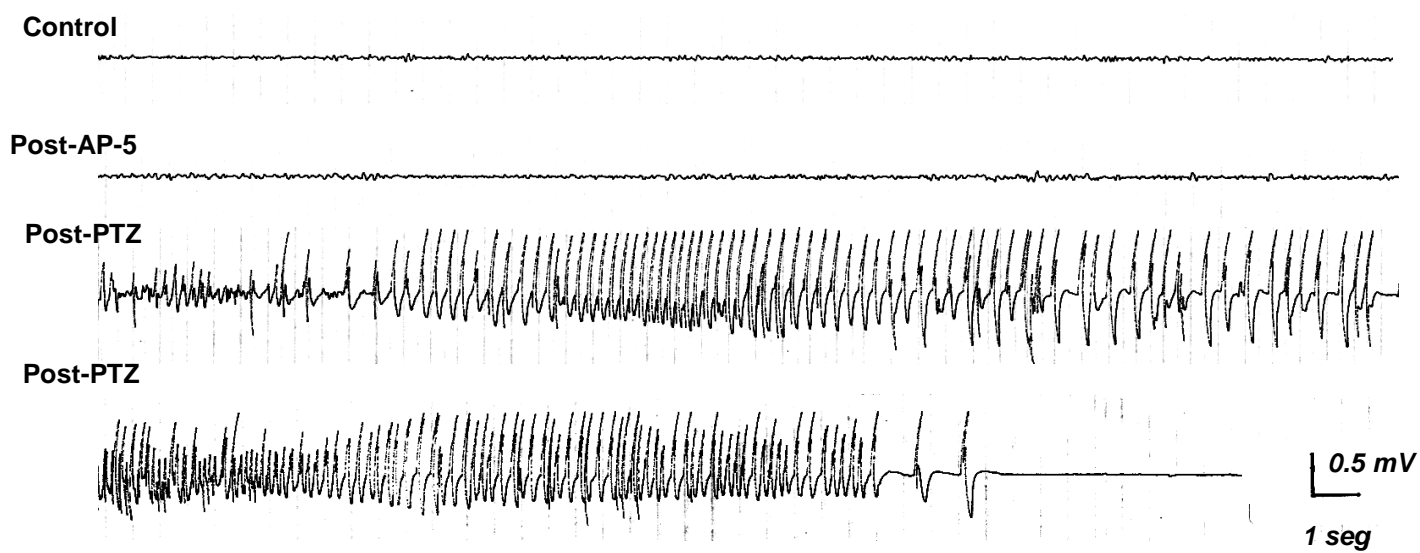


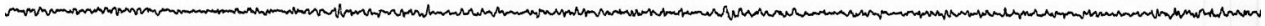
Figura 14. Ejemplo del registro de actividad electroencefalográfica del grupo al que se le administró AP-5.



**Control**



**Post-MK-801**



**Post-PTZ**

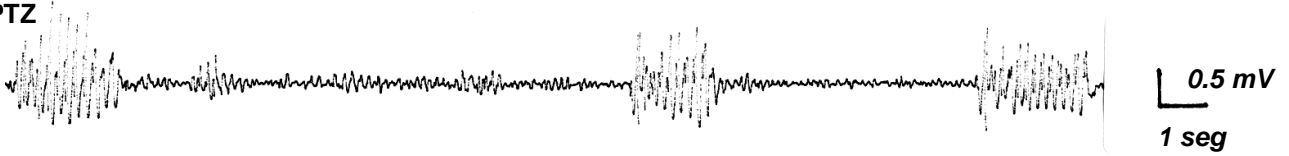


Figura 15. Ejemplo del registro de actividad electroencefalográfica del grupo al que se le administró MK-801.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos mostraron que el AP-5 y el MK-801, antagonistas competitivo y no competitivo del receptor a NMDA, microinyectados en el NGi, protegieron contra las crisis provocadas por PTZ. Un resultado consistente con la administración sistémica de dichos antagonistas así como su administración tópica en otros modelos de epilepsia, como focos epilépticos inducidos por cobalto (51,54) y administración intraventricular en ratones E1. Sin embargo, en nuestro trabajo se utilizaron cantidades mucho menores a las reportadas en otros modelos, por administración i.p. se reportan desde 1.8  $\mu\text{mol}$  de AP-5 (53), y en otros sustratos neuroanatómicos como son la amígdala e hipocampo donde se administraron 70 nmol de AP-5 (51,52,73). Mientras que en nuestro estudio se utilizaron únicamente 10 y 20 nmol de dicho compuesto. En el caso del MK-801 los resultados con 6 nmol no fueron significativos en aumentar el tiempo de latencia a la CTCG mientras que los de 12 nmol si lo fueron, lo cual sugiere un efecto dependiente de la dosis. Sin embargo, aun cuando la administración de 6 nmol de MK-801 no aumentó de forma significativa la latencia a las CTCG, si aumentó el porcentaje de animales que sobrevivieron y disminuyó el numero de animales que presentaron las CTCG de forma significativa por lo que convendría realizar un tercer grupo con una cantidad mayor del compuesto para determinar si efectivamente es dependiente de la dosis.

Los antagonistas a NMDA no-competitivos y competitivos administrados de forma sistémica han demostrado tener propiedades anticonvulsivantes en varios modelos de epilepsia como NMDA, ácido quinolinico, bicuculina, cámara hiperbárica, ratones E1, kindling eléctrico, ya sea inhibiendo o retardando las crisis convulsivas, sin embargo, en dichos estudios no es posible determinar el sustrato neuroanatómico involucrado (26,51,52,57,58,59,73). Nuestro estudio localizó un núcleo específico en la regulación de la actividad epiléptica mediante la microinyección estereotáxica, una técnica que permite definir cuales núcleos tienen la capacidad de suprimir, retardar o potenciar las crisis.

Hoy en día se tienen estudios del rol de los receptores a NMDA en la

propagación de las crisis convulsivas en distintos sustratos neuroanatomicos, pero no una caracterización de cada núcleo que compone a dichos sustratos, en un trabajo anterior de nuestro laboratorio se logró caracterizar parte de la formación reticular pontina determinándose que era la transmisión glutamatérgica en los núcleos pontis caudalis y pontis oralis la que participaba en la propagación de las crisis convulsivas en un modelo de PTZ (60).

La distribución de los receptores a NMDA en la formación reticular bulbar no ha sido muy estudiada, sin embargo, estos resultados apoyan que la transmisión glutamatérgica en el NGi juega un papel importante en la propagación de las CTCG en este modelo, se conoce que dicho núcleo está involucrado en procesos de movimientos de orejas, rostro, la parte superior del torso, contracción de los músculos del cuello, locomoción de extremidades superiores e inferiores, en la regulación de la presión arterial, movimientos oculares y la postura (62,64,65), al ser un núcleo que participa en la actividad motora es de esperarse que esté involucrado en la parte conductual de la actividad epiléptica, mioclonias faciales y de miembros anteriores y posteriores, si en dicho núcleo es la transmisión glutamatérgica (excitadora) o GABAérgica (inhibitoria) la que participa ahora podemos asegurar que la glutamatérgica tiene un papel importante y actualmente nos encontramos realizando microinyecciones de potencializadores del GABA como el ácido valproico y poder determinar si es solo el glutamato el involucrado en la actividad epiléptica o también el GABA participa en este núcleo.

Conductualmente se observaron dos efectos completamente distintos posteriores a la microinyección de AP-5 y MK-801, en tanto que tras la administración de AP-5 todas las ratas presentaron giro contralateral con respecto a la microinyección, siendo en el grupo de 20 nmol en el cual el giro contralateral fue mayor, además 25% de los animales presentaron giro de barril también contralateral, las ratas administradas con MK-801 presentaron un efecto de sedación. Respecto a las antagonistas no-competitivos la sedación es un efecto secundario de su administración, por ejemplo la ketamina, un preanestésico, tiene una débil interacción del tipo no-competitivo como antagonista del receptor a NMDA y se considera que es esta débil

interacción lo que la provee de su efecto sedante (26-29). Dado que el NGi está involucrado en el control del movimiento de las extremidades tanto anteriores como posteriores (62,64,65) la microinyección unilateral de AP-5 inhibe de forma parcial la actividad motora de una porción del cuerpo, esto podría explicar la razón del giro contralateral con respecto al sitio de microinyección, dicho giro aumentó al administrarse el PTZ, el cual al disminuir la inhibición producida por el GABA (15,18,19), potencio la acción excitadora del glutamato rompiendo el equilibrio entre inhibición y excitación causando que la actividad motora aumentara y con ello se incrementara el giro en este grupo.

Así como hay diferencias conductuales entre los grupos administrados con AP-5 o MK-801 también en el registro EEG hay diferencias importantes; las ratas administradas con AP-5 presentaron una actividad eléctrica de gran amplitud y duración, las ratas administradas con MK-801 presentaron durante la duración del experimento actividad eléctrica de menor amplitud y duración, pequeñas postdescargas asociadas a mioclonias de miembros anteriores. Se sabe que el MK-801 tiene una fuerte afinidad hacia el canal iónico del receptor y que incluso promueve el cierre del mismo (24,26,29,55), dicho efecto puede ser el responsable de que la actividad eléctrica disminuyera en estas ratas en tanto que el AP-5 al tener que competir con el glutamato no produce una inhibición igual de potente por lo cual la actividad eléctrica es mayor, sin embargo esta actividad es aun menor comparada a la del grupo control.

Se sabe que los antagonistas no-competitivos a NMDA son más potentes que los del tipo competitivo (24), sin embargo, en el presente trabajo vemos que la microinyección en este núcleo el AP-5 es más potente al haber aumentado tanto el tiempo de latencia a CTCG de forma significativa, como el porcentaje de supervivencia, siendo igual en la administración de 10 y 20 nmol en tanto que el grupo de MK-801 al que se le administró 12 nmol tuvo un mayor porcentaje de supervivencia que el de 6 nmol, además de que dicho grupo no aumentó la latencia a CTCG de forma significativa.

Al realizarse microinyecciones de AP-5 en los núcleos dorsal paragigantocelular (DPGi), núcleo intermedio reticular (IRt) y MK-801 en el núcleo lateral paragigantocelular (LPGi), núcleos adyacentes al NGi, se observó la misma conducta, giro con AP-5 y sedación con MK-801, lo cual sugiere que estos núcleos están estrechamente relacionados en la transmisión glutamatérgica, en estudios que se han hecho sobre el núcleo paragigantocelular se ha visto que comparte conexiones con varios de los núcleos que el NGi (63), pudiendo ser estas conexiones lo que provoque la inhibición o retardo de las CTCG. Una segunda posibilidad es la difusión del volumen microinyectado desde estos núcleos adyacentes hasta el NGi, se ha reportado que microinyecciones de 0.2  $\mu$ L pueden difundir hasta 0.5 mm del sitio de microinyección (75), en futuros trabajos se analizaran estos núcleos y así mapear toda esta zona de la formación reticular.

## CONCLUSIONES

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

- A. La microinyección de MK-801 en el NGi ejerció un efecto protector estadísticamente significativo, sobre las crisis inducidas por PTZ respecto al grupo control.
- B. El AP-5, al ser microinyectado en el NGi presentó un efecto protector, estadísticamente significativo, sobre las crisis inducidas por PTZ.
- C. La transmisión glutamatergica, específicamente la relacionada con los receptores a NMDA, en el NGi, tiene un papel importante en la propagación de las CTCG, ya que la administración de un antagonista no competitivo, MK-801, y la de uno del tipo competitivo, AP-5, redujeron de manera significativa tanto la actividad conductual como electroencefalográfica en el modelo de PTZ.

## REFERENCIAS

1. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel, Jr J. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005;46;470-472.
2. Elger CE, Schmidt D. Modern Management of epilepsy: A practical approach. *Epilepsy and Behavior*. 2008;12;501-539.
3. Angus-Leppan H, Parsons LM. Epilepsy: epidemiology, classification and natural history. *Medicine*. 2008;36;571-578.
4. Banerjee PN, Pillippi D, Hauser WA. The descriptive epidemiology of epilepsy-A review. *Epilepsy Research*. 2009;85;31-45
5. Cloix JF, Hévor T. Epilepsy, regulation of brain energy metabolism and neurotransmission. *Current Medicinal Chemistry*. 2009;16;841-853.
6. Kaneko S, Okada M, Iwasa H, Yamakawa K, Hirose S. Genetics of epilepsy: current status and perspectives. *Neuroscience Research*. 2002;44;11-30.
7. Kaneko S, Wada K. Molecular genetic studies of epilepsies. *Brain and Nerve*. 1998;50;1071-1077.
8. Delgado-Escueta AV, Serratosa JM, Liu A, Weissbecker K, Medina MT, Gee M, Treiman LJ, Sparkes RS. Progress in mapping human epilepsy genes. *Epilepsia*. 1994; 35 (Suppl 1);29-40.
9. Phillips HA, Marini C, Scheffer IE, Sutherland GR, Mulley JC, Berkovic SF. A de novo mutation in sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*. 2000;48;264-267.
10. Ushida M, Fukuda T, Nishiyama I, Nkano O, Endo S, Fukuda K, Ohta A, Kondo I, Furukawa S. Analysis of the KCNQ2 gene in Japanese families with benign familiar neonatal convulsions (BFNC). *Nihon Shonikagakkai Zasshi*. 2001;105;780-784.
11. Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL, Jr Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel  $\beta$ 1 subunit gene SCN1B. *Nature Genetics*. 1998;19;366-370.

12. Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bower DN, Panchal RG, Williams DA, Sutherland GR, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF. Mutant GABAA receptor  $\gamma$ 2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nature Genetics*. 2001;28;49-52.
13. Noachtar S, Rémi J. The role of EEG in epilepsy: A critical review. *Epilepsy and Behavior*. 2009;15;22-33.
14. Jefferys JGR. Models and Mechanisms of Experimental Epilepsies. *Epilepsia*. 2003;44(Suppl.12);44-50.
15. Fisher RS. Animal models of the epilepsies. *Brain Research Reviews*. 1989;14;245-278.
16. Dichter MA. Models of epileptogenesis in adult animals available for antiepileptogenesis drug screening. *Epilepsy Research*. 2006;68;31-35.
17. Löscher W, Schmidt D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Research*. 1988;2;145-481.
18. De Deyn PP, D'Hooge R, Marescau B, Pei YQ. Chemical models of epilepsy with some references to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Research*. 1992;12;87-110.
19. Rubio C, Rubio-Osornio M, Retana-Márquez S, López M, Custodio V, Paz C. In vivo experimental models of epilepsy. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 2010;10;298-309.
20. Bennett MR, Balcar VJ. Forty years of amino acid transmission in the brain. *Neurochemistry International*. 1999;35;269-280.
21. Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, White HS. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry International*. En línea 18 Febrero 2012.
22. McLennan H. Receptors for the excitatory amino acids in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*. 1982;20;251-271.
23. Muir KW. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006;6;53-60.
24. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate Receptor Ion



- Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*. 2010;62;405-496.
25. Kalia LV, Kalia SK, Salter MW. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurology*. 2008;7;742-755.
  26. Ghasemi M, Schachter SC. The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review. *Epilepsy and Behavior*. 2011;22;617-640.
  27. Hedegaard M, Hansen KB, Andersen KT, Bräuner-Osborne H, Traynelis SF. Molecular pharmacology of human NMDA receptors. *Neurochemistry International*. En prensa 17 diciembre 2011.
  28. Ogden KK, Traynelis SF. New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2011;32;726-732.
  29. Chen HSV, Lipton SA. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry*. 2006;97;1611-1626.
  30. Urbanska EM, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski WA. Excitatory amino acids in epilepsy. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 1998;13;25-39.
  31. Carter DS, Deshpande LS, Rafiq A, Sombati S, Delorenzo RJ. Characterization of spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal-entorhinal cortical slices prepared from chronic epileptic animals. *Seizure*. 2011;20;218-224.
  32. Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, Mackinnon R. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 1998;280;69-77.
  33. Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*. 2009;462;745-756.
  34. Chen GQ, Cul C, Mayer ML, Gouaux E. Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature*. 1999;402;817-821.
  35. Kidd FL, Isaac JTR. Developmental and activity-dependent regulation of kainite receptors at thalamocortical synapses. *Nature*. 1999;400;569-573.
  36. Kwon HB, Castillo PE. Role of glutamate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*. 2008;60;1082-1094.

37. Sachidhanandam S, Blanchet C, Jeantet Y, Cho YH, Mulle C. Kainate receptors act as conditional amplifiers of spike transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *Journal of Neuroscience*. 2009;29;5000-5008.
38. Gu JG, Albuquerque C, Lee CJ, MacDermott AB. Synaptic strengthening through activation of Ca<sup>2+</sup> permeable AMPA receptors. *Nature*. 1996;381;793-796.
39. Bloodgood BL, Sabatini BL. Ca<sup>2+</sup> signaling in dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*. 2007;17;345-351.
40. Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: Multiple forms, functions and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33;18-41.
41. Fast neurotransmitter release triggered by Ca influx through AMPA-type glutamate receptors. *Nature*. 2006;443;705-708.
42. Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL. Calcium-dependent inactivation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is NR2 subunit specific. *Molecular Pharmacology*. 1996;50;1680-1688.
43. Regalado MP, Villarroel A, Lerma J. Intersubunit cooperativity in the NMDA receptor. *Neuron*. 2001;32;1085-1096.
44. Medina I, Filippova N, Charton A, Rougeole S, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M, Bregestovski P. Calcium-dependent inactivation of heteromeric NMDA receptor-channels expressed in human embryonic kidney cells. *Journal of Physiology*. 1995;482;567-573.
45. Lipton SA, Rosenberg PA. Mechanisms of disease: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*. 1994;330;613-622.
46. Ikonomidou C, Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurology*. 2002;1:383-386.
47. Wada Y, Hasegawa H, Nakamura M, Yamaguchi N. The NMDA receptor antagonist MK-801 has a dissociative effect on seizure activity of hippocampal-kindled cats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1992;43;1269-1272.

48. Bermudo-Soriano CR, Perez-Rodriguez MM, Vaquero-Lorenzo C, Baca-Garcia E. New perspectives in glutamate and anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2012;100;752-774.
49. Nakamura T, Lipton SA. Preventing Ca<sup>2+</sup>-mediated nitrosative stress in neurodegenerative diseases: Possible pharmacological strategies. *Cell Calcium*. 2010;47;190-197.
50. Hsieh MH, Gu SL, Ho SC, Pawlak CR, Lin CL, Ho YJ, Lai TJ, Wu FY. Effects of MK-801 on recognition and neurodegeneration in an MPTP-induced Parkinson's rat model. *Behavioural Brain Research*. 2012;229;41-47.
51. Bradford HF. Glutamate, Gaba and Epilepsy. *Progress in Neurobiology*. 1995;47;477-511.
52. Mody I, Heinemann U. NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling. *Nature*. 1987;326;701-704.
53. Mori A, Yokoi I, Kabuto H. 2-Amino-5-phosphonopentanoate prevents convulsions and decreases cerebral glutamate level in E1 mice. *IRCS Medical Science*. 1986;14;475.
54. Coutinho-Netto J, Abdul Ghani AS, Collins JF, Bradford HF. Is glutamate a trigger factor in epileptic hyperactivity? *Epilepsia*. 1981;22;289-296.
55. Parsons CG, Quack G, Bresink I, Baran L, Przegalinski E, Kostowski W, Krzascik P, Hartmann S, Danysz W. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology*. 1995;34;1239-1258
56. Dravid SM, Erreger K, Yuan H, Nicholson K, Le P, Lyuboslavsky P, Almonte A, Murray E, Mosely C, Beber J. Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *Journal of Physiology*. 2007;581;107-128.
57. Kubova H, Mares P. Effects of MK-801 (Dizocilpine) and ketamine on strychnine-induced convulsions in rats: Comparison with benzodiazepines and standard anticonvulsants. *Physiological Research*. 1994;43;313-320.

58. Karler R, Calder LD, Chaudhry IA, Turkanis SA. Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sciences*. 1989;45;599-606.
59. Sato K, Morimoto K, Hiramatsu M, Mori A, Otsuki S. Effect of a noncompetitive antagonist (MK-801) of NMDA receptors on convulsions and brain amino acid level in E1 mice. *Neurochemical Research*. 1989;14;741-744.
60. Manjarrez J, Alvarado R, Camacho-Arroyo I. Differential effects of NMDA antagonists microinjections into the nucleus reticularis pontis caudalis on seizures induced by pentylenetetrazole in the rat. *Epilepsy Research*. 2001;46;39-44.
61. Van der Kooy D. The reticular core of the brain-stem and its descending pathways: Anatomy and function. [In] Fromm GH, Faingold CL, Browning RA, Burnham WM (eds): "Epilepsy and the reticular formation: The role of the reticular Core in Convulsive Seizures". Alan R Liss, Inc, New York. 1987: 9-23.
62. Yen JC, Chan SHH. Passive biophysical membrane properties of nucleus reticularis gigantocellularis neurons in brain slices from the rat. *Neuroscience Letters*. 1993;159;5-8.
63. Zec N, Kinney HC. Anatomic relationships of the human nucleus paragigantocellularis lateralis. A Dil labeling study. *Anatomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2001;89;110-124.
64. Quessy S, Freedman EG. Electrical stimulation of rhesus monkey nucleus reticularis gigantocellularis: I. Characteristics of evoked head movements. *Experimental Brain Research*. 2004;156;342-356.
65. Takakusaki K. Forebrain control of locomotor behaviors. *Brain Research Reviews*. 2008;57;192-198.
66. Saadé NE, Salibi NA, Banna NR, Towe AL, Jabbur SJ. Spinal input pathways affecting the medullary gigantocellular reticular nucleus. *Experimental Neurology*. 1983;80;582-600.
67. Hikino H, Murayama M. Mechanism of the antinociceptive action of mesaconitine: participation of brain stem and lumbar enlargement. *British Journal of Pharmacology*. 1985;85;575-580.

68. Isa T, Saki S. Brainstem control of head movements during orienting; organization of the premotor circuits. *Progress in Neurobiology*. 2002;66;205-241.
69. Serafin M, Vidal PP, Mühlethaler M. Electrophysiological study of nucleus gigantocellularis neurons in guinea-pig brainstem slices. *Neuroscience*. 1996;73;797-805.
70. Peterson BW. Reticulospinal projections to spinal motor nuclei. *Annual Review of Physiology*. 1979;41;127-140
71. Serafin M, Khateb M, Mühlethaler M. Electrophysiology and Lucifer Yellow injection of nucleus gigantocellularis neurones in an isolated and perfused guinea pig brain in vitro. *Neuroscience Letters*. 1990;120;5-8.
72. Jensen TS, Yaksh TL. Brainstem excitatory amino acid receptors in nociception: microinjection mapping and pharmacological characterization of glutamate-sensitive sites in the brainstem associated with algogenic behavior. *Neuroscience*. 1992;46;535-547.
73. Holmes KH, Bilkey DK, Lavery R. The infusion of an NMDA antagonist into perirhinal cortex suppresses amygdala-kindled seizures. *Brain Research*. 1992;597;285-290.
74. Yang J, Wetterstrand C, Jones RSG. Felbamate but not phenytoin or gabapentin reduces glutamate release by blocking presynaptic NMDA receptors in the entorhinal cortex. *Epilepsy Research*. 2007;77;157-164.
75. Lohman RJ, Liu L, Morris M, O'brien TJ. Validation of a method for localized microinjection of drugs into thalamic subregions in rats for epilepsy pharmacological studies. *Journal of Neuroscience Methods*. 2005;146;191-197.