

NIVELES ENCEFALICOS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS MODIFICADOS POR CONVULSIVANTES Y ANTICONVULSIVOS

*Gpe. Digna Moreira-Muradás**
*Arturo Hernández-Mendoza**
*Daniel Pacheco-Leal***

INTRODUCCION

Desde hace algún tiempo quedó demostrado el papel de los nucleótidos cíclicos adenosín monofosfato-3'5'-cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato-3'5'-cíclico (GMPc) en el mecanismo molecular de la actividad convulsiva (Ferrendelli y Kinscherf, 1977; Ferrendelli, Gross, Kinscherf y Rubin, 1979; Ferrendelli, Blank y Gross, 1980; Lewin, Golden y Walker, 1976; Lust, Goldberg y Passonneau, 1976; Myllyla, 1976).

De hecho, algunos autores (Hevor y Gayet, 1979; Stone, Taylor y Bloom, 1975) y nosotros (Pacheco-Leal, Moreira-Muradás y Hernández-Mendoza, 1984) hemos sugerido que estos nucleótidos cíclicos se modifican en dirección opuesta durante las convulsiones inducidas por ciertas sustancias en animales. Desde este punto de vista, el GMPc parece ser el responsable de la actividad convulsiva (Hevor y Gayer, 1979) mientras el AMPc parece ser la señal que detiene la convulsión (Wood, Lake, Ziegler, Sode, Brooks y Van Buren, 1977).

Otros estudios han demostrado que el mecanismo de acción molecular de ciertos anticonvulsivos involucra a estos nucleótidos cíclicos (Mao, Guidotti y Costa, 1975; Palmer, 1979;

Szmigielski y Guidotti, 1979; York y Davies, 1982). Además, sustancias relacionadas con actividad anticonvulsiva disminuyen los niveles de GMPc cerebelar (Browne, 1980; Gumulka, Dinnendahl y Schoenhofer, 1979); otros incrementan los niveles de AMPc,¹⁶ y algunos producen aumento de AMPc y disminución de GMPc en cerebro (Palmer, Jones, Medina y Stavinoha, 1979; Kant, Muller, Lenox y Meyerhoff, 1980).

En esta comunicación se muestran los efectos de algunos agentes anticonvulsivos administrados solos o junto con agentes convulsivantes sobre los niveles de nucleótidos cíclicos, así como la correlación entre efectividad anticonvulsiva y capacidad para aumentar AMPc, disminuir GMPc cerebral o aumentar la relación AMPc/GMPc.

MATERIAL Y METODO

Los animales de experimentación (ratones CD1, machos, peso promedio 30 g) fueron sometidos a inoculaciones intraperitoneales de *a*) agentes anticonvulsivos y *b*) agentes anticonvulsivos más convulsivantes. Las dosis de anticonvulsivos fueron: fenitoína, 75 mg/kg; fenobarbital, 25 mg/kg; carbamazepina, 25 mg/kg; diazepam, 7 mg/kg; clonazepam, 7 mg/kg; y valproato de sodio, 333 mg/kg. Diazepam, clonazepam y carbamazepina se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMS) al 60%, mientras que fenobarbital, fenitoína y valproato se di-

* Instituto Nacional de Ciencias y Tecnología-DIF, México, D.F.

** Profesor titular de Bioquímica Aplicada. Escuela Superior de Medicina, IPN, México.

solieron en agua destilada. Estas dosis son equianticonvulsivas.

Se incluyó en el estudio un agente anticonvulsivo, agonista del GABA, diseñado por Carvajal (Carvajal y Massieu, 1978): el gamma-hidroxi-gamma-etil-gamma-fenil butiramida (HEPB). La dosis fue de 120 mg/kg, y fue disuelto en agua destilada.

Todas las sustancias se prepararon en el momento de ser utilizadas. Los animales control fueron inoculados con un volumen equivalente de DMS o de agua destilada. El tiempo de administración de cada sustancia antes de sacrificar el animal depende de su máxima acumulación en encéfalo.

Las sustancias convulsivantes se administraron intraperitonealmente a las siguientes dosis: tiosemicarbazida (TS), 20 mg/kg, en un volumen de 0.01 ml de solvente por gramo de peso corporal. Los ratones se dividieron en grupos de 10 animales cada uno: *a*) ratones no tratados (niveles basales); *b*) ratones control, inoculados con solvente; *c*) ratones sacrificados en el periodo preconvulsivo; *d*) ratones sacrificados en la convulsión clónica; *e*) ratones sacrificados en el periodo interconvulsivo, y *f*) ratones sacrificados en el periodo de convulsión tónica. Como la presentación de cada tipo de convulsión depende del convulsivante empleado, fue necesario establecer previamente el tiempo de presentación de la convulsión clónica y tónica para cada convulsivante con y sin anticonvulsivo.

Usualmente los anticonvulsivos se administraron antes que la tiosemicarbazida, excepto valproato y HEPB que se acumulan en 15-20 minutos mientras que la TS se acumula en 30 minutos, así que en estos casos la TS se administró primero. Los otros anticonvulsivos se administraron 50 minutos antes de los convulsivantes.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. El encéfalo se extirpó rápidamente y se colocó en una mezcla de acetona-hielo seco. Las muestras de tejido se procesaron y homogeneizaron en tris-HCl 0.04 M frío, pH 8 (solución final 10% peso de tejido-vol., de amortiguador) usando un homogeneizador *Potter* con pistilo de teflón. Se tomaron alícuotas para determinar proteínas por el método de

Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr y Randall, 1951). Una vez homogeneizado se agregó TCA frío al 12% y la mezcla se centrifugó a 2 500 g a 4°C por 115 minutos. El precipitado se eliminó y el sobrenadante se sometió a dos extracciones con 10 ml de éter etílico saturado con agua cada una para eliminar el TCA. La fase etérea se eliminó y la solución acuosa se evaporó en un baño de agua de 80°C con flujo de aire. El residuo seco se disolvió con 1 ml de amortiguador de acetatos 50 mM pH 6.2 y se determinó el contenido de nucleótidos cíclicos por radioinmunoensayo (Steiner, Parker y Kipnis, 1972). Los kits de AMPc y GMPc con ^{125}I como marcador fueron suministrados por New England Nuclear a través del ININ y las muestras fueron contadas en un contador gamma ANSR de *Abbott*. Los resultados se reportan en picomoles de nucleótido cíclico por mg de proteína.

Algunos anticonvulsivos inhibieron totalmente la convulsión tónica y/o clónica, por lo que estos animales fueron sacrificados en tiempos fijados arbitrariamente.

Los anticonvulsivos fueron clasificados y ordenados de acuerdo a su capacidad para abolir o prolongar la convulsión clónica y tónica; para elevar el AMPc; disminuir el GMPc o aumentar el valor de la relación AMPc/GMPc.

El análisis estadístico de los datos se realizó por medio de pruebas de correlación de Pearson, coeficiente de concordancia de Kendall (Siegel, 1978) y prueba *t*-student.

RESULTADOS

I. Efecto de anticonvulsivos sobre los niveles encefálicos de AMPc y GMPc.

Los anticonvulsivos empleados elevaron significativamente los niveles de AMPc con respecto al control, mientras que los niveles de GMPc fueron menores que los valores control con todos los anticonvulsivos (Fig. 1) en un ordenamiento que se muestra en la tabla I. El criterio de clasificación se explica en material y método.

II. Acción anticonvulsiva y efecto sobre los niveles de nucleótidos cíclicos modificados por convulsivantes.

La efectividad anticonvulsiva (tabla III) para prolongar o abolir la convulsión clónica y la convulsión tónica fue correlacionada con la capacidad del anticonvulsivo para elevar los niveles de AMPc (hábitos por los convulsivantes); para disminuir los niveles de GMPc (elevados por los convulsivantes), y para elevar la relación AMPc/GMPc (disminuida por los convulsivantes) tabla II.

La única correlación significativa ($p=0.01$) entre la capacidad para elevar el AMPc, para disminuir el GMPc y para elevar la relación AMPc/GMPc la dio el convulsivante TS (tabla IV). Sin embargo, correlacionando individualmente la capacidad para prolongar o abolir la convulsión tónica y/o clónica para elevar el AMPc, disminuir el GMPc o aumentar la relación AMPc/GMPc indica que los

TABLA I.

EFFECTO DE ANTICONVULSIVOS ADMINISTRADOS SIN CONVULSIVANTE SOBRE LOS NIVELES CEREBRALES DE NUCLEOTIDOS CICLICOS Y LA RELACION AMPc/GMPc. ORDENAMIENTO DE ACUERDO A LA FIG. 1.

AMPc	GMPc	AMPc/GMPc
Fenobarbital	HEPB	Fenobarbital
Fenitoína	Fenobarbital	HEPB
HEPB	Diazepam	Valproato
Valproato	Fenitoína	Clonazepam
Clonazepam	Carbamazepina	Diazepam
Diazepam	Clonazepam	Fenitoína
Carbamazepina	Valproato	Carbamazepina

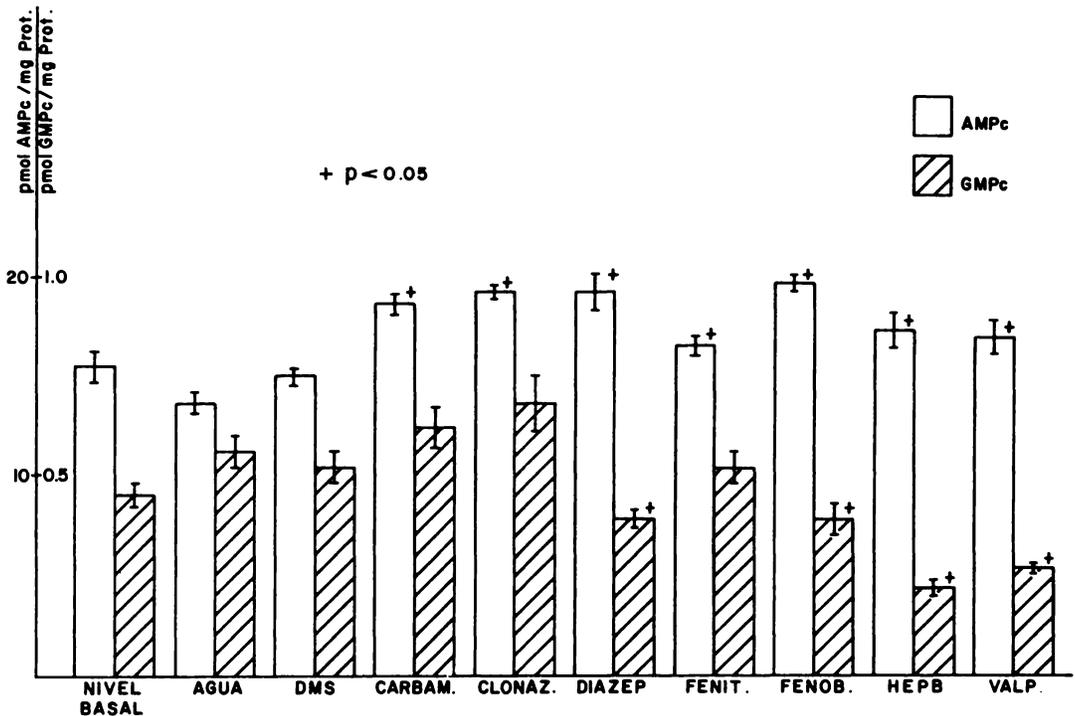


Fig. 1. Efecto de diferentes anticonvulsivos sobre los niveles cerebrales de AMPc y GMPc.

TABLA II.
EFFECTO DE ANTICONVULSIVOS Y CONVULSIVANTES SOBRE LOS NIVELES DE NUCLEOTIDOS CICLICOS Y LA RELACION AMPc/GMPc.

Anticonvulsivo	Tiosemicarbazida		Pentilentetrazol		Estricnina	
	AMPc*	GMPc*	AMPc*	GMPc*	AMPc	GMPc**
HEPB	16.01	1.00	17.02	0.62	18.21	0.77
Fenobarbital	17.98	0.78	29.45	0.60	33.00	0.62
Valproato de Sodio	15.94	0.57	20.58	0.91	16.93	0.56
Fenitoina	23.25	0.53	18.98	0.86	23.44	0.83
Diazepam	30.66	0.73	33.89	1.32	29.84	0.71
Clonazepam	48.08	0.30	45.07	0.38	37.87	1.24
Carbamazepina	18.20	1.06	29.98	1.48	34.86	0.98
Ninguno	21.88	0.99	21.18	1.38	25.46	0.90

* Valores de AMPc y GMPc en pmol/mg de proteína.

** Entre paréntesis valores de la relación AMPc/GMPc.

valores más altos corresponden siempre a la relación AMPc/GMPc a expensas de aumento de AMPc.

Por otro lado, se realizaron correlaciones parciales en cada grupo de 10 animales entre tiempo de convulsión clónica o convulsión tónica con los niveles individuales de AMPc, GMPc y relación AMPc/GMPc (tabla V). Aunque los resultados no son muy consistentes y no todos los valores de *r* son significativos, se presenta una situación similar a las correlaciones entre efectividad anticonvulsiva y capacidad para elevar el AMPc y la relación AMPc/GMPc.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Durante la actividad convulsivante se demuestra una vez más la participación de los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc. Los convulsivantes empleados muestran una tendencia a disminuir o modificar poco al AMPc, a elevar el GMPc, y por tanto, a disminuir el valor de la relación AMPc/GMPc lo cual concuerda con los resultados de algunos investigadores.

Asimismo, la acción anticonvulsiva al parecer también involucra a los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc modificando sus niveles en sentido opuesto a lo provocado por los convulsivantes.

Al correlacionar la capacidad anticonvulsiva manifestada por una prolongación o abolición de los tiempos de presentación de las convulsiones tónica o clónica con la capacidad para elevar AMPc, disminuir GMPc o elevar la relación AMPc/GMPc, encontramos que los factores más importantes que determinan el que un anticonvulsivo sea más efectivo, son niveles de AMPc y la relación AMPc/GMPc. Esto nos lleva a considerar que un agente que eleve los niveles de AMPc, por ejemplo un adrenérgico asociado a un anticonvulsivo, potenciaría la capacidad de este último como anticonvulsivo.

Por el contrario, agentes químicos o farmacológicos que eleven los niveles de GMPc a cualquier condición fisiológica que provoque la misma situación, serían factores antagonistas al efecto anticonvulsivo de un fármaco antiépiléptico. Esto fue comprobado en ratones que recibieron accidentalmente un compuesto

organofosforado anticolinérgico usado como antiparasitario, el neguvón, el cual elevó los niveles de GMPc y no dio protección con el anticonvulsivo fenitoína (datos no presentados).

Cada convulsivante empleado en nuestro experimento es considerado como modelo experimental para un tipo determinado de epilepsia: metrazol, para crisis de ausencias o pequeño mal (Vida, 1977); tiosemicarbazida, modelo de convulsiones provocadas por alteraciones metabólicas que afectan la formación del GABA, y estricnina, para seleccionar anti-epilépticos cuyo mecanismo de acción es postsináptico (Pacheco-Leal y cols., 1982). De este

modo la clasificación de anticonvulsivantes de acuerdo a su efectividad contra las convulsiones inducidas por cada convulsivante permite establecer la terapéutica adecuada para un tipo determinado de crisis.

En virtud de haber establecido que el AMPc es un factor asociado a la abolición de las convulsiones, en nuestros futuros trabajos usaremos sustancias que eleven el AMPc, como los beta-adrenérgicos o derivados del AMPc que atraviesen la barrera hematoencefálica y sean resistentes a la fosfodiesterasa, como el dibutilril-AMPc, para asociarlos con agentes anticonvulsivos en el tratamiento de la epilepsia.

TABLA III.

CLASIFICACION DE LOS ANTICONVULSIVOS SEGUN SU POTENCIA ANTICONVULSIVA Y SU CAPACIDAD PARA AUMENTAR EL AMPc, DISMINUIR EL GMPc Y AUMENTAR LA RELACION AMPc/GMPc.

Convulsión clónica	Convulsión tónica	AMPc ↑	GMPc ↓	AMPc/GMPc ↑
TIOSEMICARBAZIDA				
Diazepam	Diazepam	Clonazepam	Clonazepam	Clonazepam
Clonazepam	Clonazepam	Diazepam	Fenitoína	Fenitoína
Valproato	Fenitoína	Fenitoína	Valproato	Diazepam
HEPB	Fenobarbital	Carbamazepina	Fenobarbital	Valproato
Carbamazepina	Valproato	Fenobarbital	Diazepam	Fenobarbital
Fenobarbital	HEPB	HEPB	HEPB	Carbamazepina
Fenitoína	Carbamazepina	Valproato	Carbamazepina	HEPB
PENTILENTETRAZOL				
Diazepam	Diazepam	Clonazepam	Clonazepam	Clonazepam
Clonazepam	Clonazepam	Diazepam	Fenobarbital	Fenobarbital
Valproato	Valproato	Carbamazepina	HEPB	HEPB
Carbamazepina	Fenobarbital	Fenobarbital	Fenitoína	Diazepam
HEPB	HEPB	Valproato	Valproato	Valproato
Fenobarbital	Fenitoína	Fenitoína	Diazepam	Fenitoína
Fenitoína	Carbamazepina	HEPB	Carbamazepina	Carbamazepina
ESTRICNINA				
Diazepam	Diazepam	Clonazepam	Valproato	Fenobarbital
Carbamazepina	Carbamazepina	Carbamazepina	Fenobarbital	Diazepam
Fenobarbital	Fenobarbital	Fenobarbital	Diazepam	Carbamazepina
Clonazepam	Fenitoína	Diazepam	HEPB	Clonazepam
Fenitoína	Valproato	Fenitoína	Fenitoína	Valproato
Valproato	Clonazepam	HEPB	Carbamazepina	Fenitoína
HEPB	HEPB	Valproato	Clonazepam	HEPB

TABLA IV.

CORRELACION ENTRE PODER ANTICONVULSIVO Y AUMENTO DE AMPc, DISMINUCION DE GMPc O AUMENTO DE LA RELACION AMPc/GMPc. (PRUEBA DE KENDALL).

	Tiosemicarbazida		Pentilentetrazol		Estricnina	
	W	S	W	S	W	S
Convulsión clónica	0.762 *	192	0.587	148	0.349	88
↑ AMPc	0.642	72	0.857	96	0.821	92
↓ GMPc	0.517	58	0.392	44	0.428	48
AMPc/GMPc	0.625	70	0.607	68	0.928	104
Convulsión tónica	0.762 *	192	0.587	148	0.349	88
↑ AMPc	0.857	96	0.767	86	0.642	72
↓ GMPc	0.803	90	0.625	70	0.571	64
AMPc/GMPc	0.910	102	0.803	90	0.875	98

* Significativo $p < 0.01$

TABLA V.

VALORES DE r OBTENIDOS PARA AMPc, GMPc Y LA RELACION AMPc/GMPc CON RESPECTO AL TIEMPO DE CONVULSION TONICA.

Anticonvulsivo	Convulsivante	↑ AMPc	↓ GMPc	↑ $\frac{AMPc}{GMPc}$
HEPB	TS	0.86 *	-0.05	0.48
	PTZ	0.33	-0.028	0.05
	STR	-0.10	-0.09	-0.35
Fenobarbital	STR	0.79 *	0.07	0.37
Clonazepam	STR	0.21	0.08	0.25
Carbamazepina	TS	0.08 *	0.13	0.64**
	PTZ	-0.13	-0.11	-0.38
Valproato	TS	0.42	0.37	0.51
	STR	-0.017	0.27	-0.24
Fenitoína	PTZ	-0.36	-0.03	-0.22
	STR	0.66 **	-0.37	0.31

* $p < 0.01$

** $p < 0.05$

No se indican los valores de r para los anticonvulsivos que abolieron la convulsión tónica. Los valores correspondientes a los convulsivantes cuya convulsión fue abolida tampoco se presentan.

RESUMEN

La administración intraperitoneal de pentilentetrazol (PTZ), tiosemicarbazida (TS) y estricnina (STR) a ratones produce elevación de GMPc y disminución de AMPc cerebrales desde la etapa preconvulsiva hasta la convulsión tónica. Si previamente se administran los anticonvulsivos —fenitoina, fenobarbital, carbamazepina, clorazepam, diazepam, valproato de sodio o HEPB— se prolongan los tiempos de presentación de la convulsión clónica y tónica y no se presenta la elevación de GMPc ni la disminución de AMPc que se observa con el convulsionante solo. Los anticonvulsivos administrados por separado elevaron significativamente el AMPc y sólo valproato, diazepam, fenobarbital y HEPB disminuyeron los niveles de GMPc con respecto a niveles basales.

La actividad anticonvulsiva parece pues más relacionada con la capacidad para elevar el AMPc que para disminuir el GMPc.

SUMMARY

The intraperitoneal administration of pentylenetetrazol (PTZ), thiosemicarbazide (TS), strychnine (STR) to mice produced a rise in cyclic GMP and a decrease in cyclic AMP cerebral basal levels from preconvulsive to tonic convulsive period. Pretreatment with anticonvulsant drugs, —phenytoin, phenobarbital, carbamazepine, clonazepam, diazepam and sodium valproate— prolonged the clonic and tonic convulsion times of on-set and prevented the convulsant-induced rise in cyclic GMP and decrease in cyclic AMP cerebral levels. The anticonvulsant agents alone significantly elevated cyclic AMP and only valproate, diazepam and phenobarbital significantly decreases cyclic GMP with regard to control levels. The anticonvulsant activity was apparently more related with the ability to increase cyclic AMP than that to decrease cyclic GMP.

BIBLIOGRAFIA

1. Browne, Th. R. (1980). "Valproic acid". *The New England Journal of Medicine*. 302 (12): 661-66.

2. Carvajal y Massieu, G., 1978.

3. Ferrendelli, J.A. y Kinscherf, D.A. (1977). "Cyclic nucleotides in epileptic brain: Effects pentylenetetrazol on regional cyclic AMP and cyclic GMP levels in vivo". *Epilepsia*, 18 (4): 525-531.

4. Ferrendelli, J.A., Gross, R.A., Kinscherf, D.A. y Rubin, E.H. (1979). "Effects of seizures and anticonvulsants drugs on cyclic nucleotide regulation in the CNS". In: *Neuropharmacology of cyclic nucleotides. Symposium on Neuropharmacology of cyclic nucleotides.* (G. Palmer Ed.), pp. 211-227. Urban and Schwarzenberg, Baltimore.

5. Ferrendelli, J.A., Blank, A.C. y Gross, R.A. (1980). "Relationships between seizure activity and cyclic nucleotide levels in brain." *Brain Res.*, 200: 93-103.

6. Gumulka, S.W. Dinnendahl, W. y Schoenhoefer, P. S. (1979). "Baclofen and cerebellar cyclic GMP levels in mice". *Pharmacology* (BASEL), 19 (2): 75-81.

7. Hevor, T.K. y Gayet, J. (1979). "Cyclic nucleotides in the brain of mice and rats submitted to the convulsant, methionine sulfoximine." *Biochem. Pharmacol.*, 28 (24): 3507-3512.

8. Kant, G.J., Muller, Th. W., Lenox, R.H. y Meyerhoff, J.L. (1980). "In vivo effects of pentobarbital and halotane anesthesia on levels of cyclic AMP and cyclic GMP in rat brain regions and pituitary". *Biochem. Pharmacol.*, 29 (13): 1891-96.

9. Kouyoumdjian, J.C., Haidamous, M., Briley, P.A. y Gonnard, P. (1979). "Action of γ -aminobutyric acid in vivo on rat cerebellar cyclic AMP content." *Cell. Mol. Biol.*, 23 (4): 415-20.

10. Lewin, E., Golden, T. y Walker, J.E. (1976). "Stimulation of cyclic AMP accumulation by pentylenetetrazol. *Exp. Neurol.* 50: 422-26.

11. Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin-phenol reagent." *J. Biol. Chem.*, 193: 265-75.

12. Lust, W.D., Goldberg, N.D. y Passoneau, J.V. (1976). "Cyclic nucleotides in murine brain: The temporal relationship of changes induced in adenosine 3'5' —monophosphate and guanosine 3', 5' —monophosphate following maximal electroshock or decapitation." *J. Neurochem.* 26: 5-10.

13. Mao, C.C., Guidotti, A. y Costa, E. (1975). "Evidence for an involvement of GABA in the mediation of the cerebellar cGMP decrease and the anticonvulsant action of diazepam." *Arch. Pharmacol.*, 289: 369-78.

14. Myllyla, V.V. (1976). "Effect of convulsions and anticonvulsive drugs on cerebrospinal fluid cyclic AMP in rabbits." *Eur. Neurol.* 14: 97-107.

15. Pacheco-Leal, D., Moreira-Muradás, G.D. y Hernández-Mendoza, A. (1982). "Drogas antiepilépticas: mecanismos de acción molecular de convulsionantes y anticonvulsivos." *Acta Médica*, Vol. XVIII, 71-72, (3, 4): 17-27.

16. ——— (1984). "Nucleótidos cíclicos cerebrales y resistencia a las convulsiones." *Acta Médica*, Vol. XX, 79-80 (3, 4): 43-50.

17. Palmer, G.C. (1979). "Interactions of antiepileptic drugs on adenylate cyclase and phosphodiesterase

- in rat and mouse cerebrum." *Exp. Neurol.* **63**: 322-35.
18. **Palmer, G.C., Jones, D.J., Medina, M.A. y Stavinoha, E.W. B.** (1979). "Anticonvulsant drug actions on *in vitro* and *in vivo* levels of cyclic AMP in the mouse brain." *Epilepsia*, **20**: 95-104.
 19. **Siegel, S.** (1978). *Estadística no paramétrica*. Editorial Trillas, S.A. México.
 20. **Steiner, A.L., Parker, C.W. y Kipnis, D.M.** (1972). "Radioimmunoassay for cyclic nucleotides". *J. Biol. Chem.*, **247**: 1106-16.
 21. **Stone, T.W., Taylor, D.A. y Bloomm F.E.** (1975). "Cyclic AMP and cyclic GMP may mediate opposite neuronal responses in the rat cerebral cortex". *Science*, **187**: 845-47.
 22. **Szmigielski, A. y Guidotti, A.** (1979). "Action of harmaline and diazepam on the cerebellar content of cyclic GMP and on the activities of two endogenous inhibitors of protein Kinase." *Neurochem. Res.*, **4** (2): 189-200.
 23. **Vida, J.A.** (1977). *Anticonvulsants. Medicinal Chemistry*, Vol. 15, Academic Press.
 24. **Wood, J.H., Lake, C.R., Ziegler, M.G., Sode, J., Brooks, B.R. y Van Buren, J.M.** (1977). "Cerebrospinal fluid norepinephrine alterations during electrical stimulation of cerebellar, cerebral surfaces in epileptic patients". *Neurology*, **27**: 716-24.
 25. **York, M.J. y Davies, L.P.** (1982). "The effect of diazepam on adenosine uptake and adenosine-stimulated adenylate cyclase in guinea-pig brain." *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **60**: 302-7.