

1990-A

REG. No. 082381015

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

LIBERACION DE (3H)-GABA EN LA SUSTANCIA NEGRA DE RATA  
BAJO EFECTO DEL L- GLUTAMATO MONOSODICO.

---

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

JAVIER GARCIA VELASCO

GUADALAJARA, JALISCO SEPTIEMBRE 1991

---

A MIS PADRES:

J. ANGEL GARCIA M.  
CARMEN VELASCO V.

A MIS HERMANOS:

HUMBERTO, MA DE LOS ANGELES, MARGARITA,  
SERGIO, SALVADOR Y ROSALVA.

A MI UNICA TIA:

MARIA VELASCO V.

A TODOS MIS SOBRINOS

A MI DIRECTOR DE TESIS

ALBERTO MORALES VILLAGRAN

A TODOS USTEDES, MI SINCERO AGRADECIMIENTO POR SU APOYO  
Y COLABORACION EN LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Neuroquímica del area de investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección del M. en C. Alberto Morales V. y la asesoría del M. en C. Carlos Beas Z.

## INDICE

CONTENIDO	PAGINA
LISTA DE ABREVIATURAS .....	1
INTRODUCCION .....	3
ANTECEDENTES .....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	29
HIPOTESIS .....	31
OBJETIVOS .....	33
MATERIALES Y METODOS .....	35
DIAGRAMA EXPERIMENTAL .....	41
RESULTADOS .....	43
DISCUSION .....	45
CONCLUSIONES .....	51
BIBLIOGRAFIA .....	53
RELACION DE TABLAS Y FIGURAS .....	66

# ABREVIACIONES

ACh	Acetilcolina
AMP	Adenosin-monofosfato
AOAA	Acido aminooxiacético
Ca <sup>++</sup>	Ion Calcio
Cl <sup>-</sup>	Ion Cloro
Da	Dopamina
DBA/2	Cepa de rata predispuesta genéticamente a convulsiones
E	Epinefrina
EDTA	Acido etilén-diamino-tetra-acético
EEM	Error estandar de la media
EGTA	Acido Etilén-glicol-tetra-acético
GABA	Acido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor GABAérgico tipo A
GABA <sub>B</sub>	receptor GABAérgico tipo B
[ <sup>3</sup> H] GABA	Acido $\gamma$ -aminobutírico marcado con tritio
GABA-T	Transaminasa del GABA
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
GMS	L-Glutamato monosódico
Glu-Synt	Glutamino-sintetasa
i. p.	Administración intraperitoneal
K <sup>+</sup>	Ion Potasio
L-Glu	L- glutamato
M	Molar
$\mu$ M	Micromolar
mseg	Milisegundos
Mg <sup>++</sup>	Ion Magnesio
$\mu$ l	Microlitros
Na <sup>+</sup>	Ion Sodio
Ne	Norepinefrina
nM	Nanomoles
PLP	Fosfato de piridoxal
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SSA-D	Deshidrogenasa del semialdehído succínico
SENaCl	Solución equimolar al GMS de Cloruro de Sodi
SSF	Solución salina fisiológica

# INTRODUCCION

El sistema nervioso es el conjunto de estructuras funcionalmente especializadas mediante las cuales el organismo responde adecuadamente a los estímulos que recibe del medio externo e interno (1). Regula e integra al resto de los sistemas del organismo y es el responsable del desarrollo y cualidades intelectuales del hombre (2). Comúnmente se divide en:

- a).- SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC), constituido por el encéfalo contenido en el cráneo y la médula espinal alojada en el conducto raquídeo (representa el nivel integrativo).
- b).- SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO (SNP) que comprende los nervios espinales y craneales.
- c).- SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO (neurovegetativo), localizado parcialmente en el SNC y en el SNP, se subdivide en parasimpático y simpático e interviene en la regulación de la actividad de las vísceras (1).

## ONTOGENIA

El sistema nervioso se diferencia a partir del ectodermo dorsal. La primera formación, en cordados, la constituye la placa neural que cambia a una hendidura neural con las crestas a cada lado, éstas se fusionan convirtiéndola en el tubo neural. En la porción rostral del tubo neural se presenta una mayor diferenciación y crecimiento, debido al futuro desarrollo en esa zona del cerebro, y el resto del tubo conformará la médula espinal. Posteriormente se presentan 3 vesículas primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, la primera y la última se dividen en dos protuberancias, de manera que se presentan 5 vesículas secundarias: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo,



metencéfalo y mielencéfalo (2). Las estructuras derivadas de las vesículas cerebrales secundarias son: del telencéfalo, se originan los hemisferios cerebrales; del diencéfalo el epitalamo, tálamo e hipotálamo; el mesencéfalo forma ventralmente los pedúnculos cerebrales y dorsalmente el tectum; el metencéfalo da origen al puente y cerebelo, y del mielencéfalo proviene el bulbo o médula oblongada (1).

## **ANATOMIA**

El SNC consiste de materia gris y blanca y esta rodeado por tres membranas o meninges que son del exterior al interior; duramadre, aracnoides y piamadre. La materia gris contiene los cuerpos celulares de las neuronas que se especializan para la conducción del impulso nervioso; la materia blanca consiste principalmente en fibras nerviosas que intervienen en los procesos neuronales, la mayoría con vaina de mielina. Tanto la materia gris como la blanca contienen además gran número de células gliales con importantes funciones auxiliares y que pueden ser de 4 tipos: astrocitos, oligodendrocitos, células microgliales y células del epéndimo (2).

La neurona esta constituida por un cuerpo o soma y prolongaciones que son de dos tipos: el axón o cilindroeje (polo efector) y las dendritas (polo receptor). La zona en que dos neuronas entran en contacto se llama sinapsis y constituye la unidad funcional de la comunicación interneuronal (1).

## FISIOLOGIA SINAPTICA

Las sinapsis (uniones sinápticas) son regiones de contacto especializado entre neuronas, entre éstas y órganos efectores o entre una neurona y una fibra muscular. Las sinapsis constituyen uno de los varios medios de comunicación entre las células.

Existen tres principales grupos de sinapsis:

1. - SINAPSIS INTERNEURONALES, entre dos neuronas.
2. - UNION NEUROMUSCULAR, entre una célula nerviosa y una muscular
3. - UNION NEUROGLANDULAR, entre una célula nerviosa y una glándula (3).

Estudios morfológicos revelan la existencia de dos tipos de especializaciones sinápticas que no están relacionadas ontogénicamente: las sinapsis eléctricas y las sinapsis químicas.

Las sinapsis eléctricas o electrotónicas carecen de polaridad referente a la direccionalidad del impulso nervioso. Estructuralmente se caracterizan por tres partes: un elemento presináptico, uno postsináptico y una estrecha hendidura o espacio sináptico de cerca de 25 nm. Se les conoce también como uniones en hendidura o "GAP". Estas uniones se caracterizan por presentar un patrón hexagonal formado por un arreglo de 6 monómeros proteicos de 26 000 daltons, (llamadas conexas), que en conjunto reciben el nombre de conexón. En la porción central de este arreglo proteico se aprecia un orificio de cerca de 2 nm de diámetro, por el cual pasan las moléculas hidrosolubles del citoplasma de una célula a la otra (fig.1) (4). Existen uniones eléctricas en los mamíferos en lugares como el núcleo vestibular lateral, el núcleo mesencefálico del trigémino y en la

unión de células bipolares y ganglionares en la retina de los primates, además de las uniones entre dos fibras musculares lisas y las existentes entre dos células musculares cardíacas (3).

Las sinapsis químicas son las más abundantes en el SNC, se denominan químicas porque la comunicación interneuronal depende de la liberación de una sustancia química (neurotransmisor) en la terminal presináptica, dicha sustancia, al interactuar con receptores específicos presentes en la membrana postsináptica determina cambios en la conductancia iónica de la misma, con la generación de una señal eléctrica (4). La transmisión mediada químicamente involucra los siguientes procesos ( los cuales a su vez son criterios que permiten identificar a una molécula como neurotransmisora en el SNC):

#### 1.- SINTESIS DEL TRANSMISOR

La sustancia transmisora generalmente es de bajo peso molecular y puede ser sintetizada en todas las regiones de la neurona, aunque la mayor proporción se sintetiza en la terminal sináptica, así como las enzimas que participan en su síntesis y las proteínas de membrana involucradas en su almacenamiento y liberación. La velocidad de síntesis del transmisor es dependiente de la concentración de enzimas biosintéticas y sustratos (5).

#### 2.- ALMACENAMIENTO DEL TRANSMISOR

La mayor parte del transmisor en una neurona es almacenada en gránulos o vesículas principalmente en la terminal sináptica, estas vesículas se requieren para:

- a) Acumular y almacenar al transmisor
- b) Regular su liberación (exocitosis).

Cada tipo de neurona tiene un sistema característico de membrana involucrado en el almacenamiento de una sustancia transmisora en particular. Esto constituye un mecanismo de protección contra las enzimas intracelulares evitando así su degradación (5).

Se ha relacionado el origen de las vesículas con las mitocondrias, con el retículo endoplásmico y con la membrana plasmática (6).

Las vesículas sinápticas varían en tamaño, forma y contenido, según los tipos de terminales sinápticas de que se trate. En la mayor parte de las sinapsis químicas del SNC así como en la terminal nerviosa de la unión neuromuscular predominan las vesículas esféricas claras, que miden de 40 a 60 nm de diámetro (7).

### 3.- LIBERACION DEL TRANSMISOR

Katz y Miledi (5) propusieron que cuando llega un estímulo a una célula nerviosa se abren canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , que regulan la entrada de estos iones a diferentes velocidades, con lo cual se origina la despolarización y apertura de los canales de  $\text{Ca}^{++}$  sensibles al voltaje. El  $\text{Ca}^{++}$  entra a la terminal siguiendo su gradiente de concentración y activa el mecanismo de liberación del transmisor, (facilita la fusión de la membrana vesicular con la membrana de la terminal nerviosa). De esta forma, aún cuando este mecanismo de acoplamiento excitación-secreción no está dilucidado, se acepta actualmente que el evento único y necesario para que la liberación ocurra es el incremento en la concentración intraterminal de  $\text{Ca}^{++}$ . Esta dependencia de  $\text{Ca}^{++}$  en procesos de secreción o liberación de sustancias intracelulares no es exclusivo del SN, sino que se ha descrito en diversos sistemas secretores (8).

Existen drogas que modifican el transporte de  $\text{Ca}^{++}$  en membranas biológicas. Entre las que incrementan el transporte de  $\text{Ca}^{++}$  se conocen dos tipos:

a) Actúan directamente en la membrana, ( ionoforos de  $\text{Ca}^{++}$  A23187 o X537A ) (9).

b) Actúan sobre el  $\text{Ca}^{++}$  secundariamente mediante la estimulación o la inhibición de los movimientos de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  a través de la membrana y de ese modo pueden simular la despolarización de la membrana que ocurre fisiológicamente cuando se excita la terminal presináptica (como la veratridina, que actúa abriendo los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al voltaje y la tetrodotoxina, que es capaz de bloquear la apertura de estos canales ) (10).

Por otro lado, entre las drogas que inhiben el transporte de  $\text{Ca}^{++}$  se incluyen aquellas que se unen a sitios específicos de la membrana impidiendo la entrada de  $\text{Ca}^{++}$ , y otras que actúan indirectamente, atrapando el  $\text{Ca}^{++}$  libre en el medio (agentes quelantes). Entre las primeras se incluyen al  $\text{Mg}^{++}$ , al rojo de rutenio y al lantano, que son cationes capaces de unirse a sitios aniónicos de la membrana que parecen participar en el transporte de  $\text{Ca}^{++}$ . El EDTA y el EGTA son los compuestos quelantes de  $\text{Ca}^{++}$  más utilizados, aunque la especificidad del EGTA por el  $\text{Ca}^{++}$  es mucho mayor que la del EDTA, ya que este se une con avidez también otros cationes divalentes como el  $\text{Mg}^{++}$  (11).

#### 4.- INTERACCION DEL TRANSMISOR CON EL RECEPTOR

Una vez liberado el transmisor este sólo es efectivo si interactúa con un receptor específico abriendo canales iónicos, o provocando cambios metabólicos en la membrana postsináptica. Todos los receptores tienen dos rasgos bioquímicos comunes: Se localizan en la cara externa de la membrana, y están constituidos por proteínas que tienen un sitio activo en el cual se une el transmisor específico.

En el caso de los aminoácidos, una subunidad de la superficie externa del receptor en la membrana sirve para ligar a la sustancia transmisora, formando un canal que permite el paso de iones específicos, mientras que en las catecolaminas otra subunidad funciona como transductor, que activa una enzima en la superficie interna de la membrana, la cual cataliza la síntesis de un segundo mensajero dentro de la célula. Un receptor puede tener subunidades específicas para la unión del transmisor, subunidades ligadas a los componentes del canal iónico y subunidades transductoras que enlazan la función del ligamiento a un proceso bioquímico o enzimático (5)

#### 5.- INACTIVACION Y ELIMINACION DEL TRANSMISOR DEL ESPACIO INTERSINAPTICO

Los mecanismos utilizados por las neuronas para eliminar el transmisor del espacio intersináptico son críticos para la transmisión sináptica ya que, si persiste el transmisor liberado por un tiempo prolongado no se podrá recibir una nueva señal, por lo que existen tres mecanismos utilizados por la neurona para inactivar el transmisor liberado: por difusión, por degradación enzimática y por recaptura.

La difusión es muy poco utilizada en sinapsis centrales. Un

ejemplo de la degradación enzimática se presenta en el caso de la acetilcolina que es hidrolizada por la acetilcolinesterasa que se localiza en el espacio intersináptico, produciendo colina y acetato. Mientras que en la mayoría de las sinápsis del SNC el mecanismo más usual de inactivación es a través del transporte activo o recaptura de alta afinidad, dependiente de la presencia de iones en el medio extracelular, como en el caso de ciertos aminoácidos y aminas neurotransmisoras (5,6).

El mecanismo de acción que un transmisor ejerce en la membrana postsináptica es de dos tipos:

a) IONOTROPICO: Modifica la conductancia en la membrana de la célula receptora a iones específicos. Por ejemplo, un incremento a la conductancia de cationes y un decremento en la conductancia de aniones llevaría a un aumento en la probabilidad de disparo de la neurona. Por el contrario, el decremento en la conductancia a cationes y un incremento en la conductancia de aniones llevaría a una disminución de la probabilidad de disparo. Estos mecanismos causan respuestas de corta duración y se incluyen en este tipo a los aminoácidos y a la acetilcolina.

b) METABOTROPICO: Modifican la concentración de mensajeros internos en la neurona como los nucleótidos cíclicos AMP y GMP. Causan respuestas a largo plazo a través del incremento de proteínas fosforiladas relacionadas con el estado de excitabilidad de la neurona, ya sea mediante mecanismos directos o a través de cambios en la permeabilidad de la membrana a iones específicos, incluyendo en este grupo a las catecolaminas (fig. 2) (12).

# ANTECEDENTES



## PAPEL DE LOS NEUROTRANSMISORES EN LAS CRISIS CONVULSIVAS

Las crisis convulsivas son un trastorno neurológico debido a una despolarización excesiva (facilitación) de la membrana neuronal que origina, por un lado, una descarga neuronal unitaria de alta frecuencia, y por el otro, cambios hiperpolarizantes compensatorios (inhibición) que tratan de regular esta descarga. De esta manera, la despolarización-hiperpolarización y las descargas neurales hipersincrónicas son la causa de la actividad convulsiva. Este fenómeno es común a todos los tejidos cerebrales, independientemente de la causa que los produce y de la región cerebral de que se trate (13).

Al estudiar los mecanismos neuroquímicos de la iniciación de las crisis, se observan cambios en los neurotransmisores que median la excitación y la inhibición. Desde 1945 Forster sugirió que la acetilcolina podría desempeñar un papel importante en los mecanismos de producción de convulsiones, ya que se demostró que aplicando ACh en la corteza cerebral de varias especies, se producían ondas definidas de actividad epileptiforme en el electroencefalograma (14).

En 1976 Pedata y col. (15), evaluaron la acción de varios convulsionantes sobre los niveles de ACh en diferentes regiones cerebrales de rata al momento de las convulsiones, observando que la bicuculina tiende a elevar los niveles de ACh en la mayoría de las regiones estudiadas (15).

La liberación sináptica de ACh es también afectada al momento de las convulsiones, observándose un incremento de la liberación espontánea en diversas regiones del SNC. El metrazol incrementa la

liberación espontánea de ACh en corteza cerebral del gato y la rata (16). La picrotoxina aumenta la liberación de ACh en corteza cerebral de gato, observándose este mismo efecto en el núcleo caudado de rata tratadas con metrazol o estriquina (17).

La observación de que el aumento de los niveles de ACh lleva a una predisposición a las crisis en los animales que genéticamente presentan convulsiones apoya la idea de la participación de la ACh en los mecanismos de producción de crisis (14).

Las catecolaminas dopamina (DA), norepinefrina (NE) y epinefrina (E), son neurotransmisores que tienen localizaciones separadas y vías neuronales distintas en el SNC. La participación de las catecolaminas en el fenómeno convulsivo no se conoce aún con precisión, aunque en varios modelos experimentales convulsivos si se observa una implicación importante de éstas. El bloqueo de la transmisión catecolaminérgica, ya sea por tratamientos farmacológicos o por destrucción de las vías noradrenérgicas, reduce el umbral convulsivo. Contrariamente, los agentes que aumentan o estimulan la transmisión catecolaminérgica reducen moderadamente la susceptibilidad a las convulsiones inducidas por fármacos o electrochoques (18).

En el sistema nervioso central de mamíferos, así como en muchos invertebrados, algunos aminoácidos están implicados en la transmisión sináptica; entre ellos se considera al glutamato y al aspartato como agentes excitadores, y al ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y la glicina como inhibidores. En el cerebro de epilépticos, tanto en el foco epiléptico como en el resto del cerebro antes y después de las crisis, los reservorios de estos aminoácidos se encuentran disminuidos (19).

EL glutamato es un potente agente excitador y causa actividad neuronal en la corteza cerebral, considerándose como un agente

iniciador de crisis, por lo que la excitación por el glutamato deberá entonces predominar sobre la inhibición del GABA, además, el glutamato media la aparición de edema cerebral que acompaña a las convulsiones (14).

El efecto excitatorio que produce el glutamato ocurre por medio de una despolarización de las neuronas a muy bajas concentraciones, tales como  $10^{-8}$  M. Esta despolarización se produce por un aumento en la permeabilidad al ión sodio, que resulta ser cinco veces mayor que la del potasio en la membrana postsináptica. La acción del aspartato es muy similar a la del glutamato, pero en la mayoría de los casos es menos potente (19).

Con la implantación de cobalto en la corteza frontal del gato, administración de metrazol a gatos u oubaina a ratas se observa que los niveles de taurina, glutamato, aspartato y GABA disminuyen durante las convulsiones (20), así como en el foco de actividad epiléptica máxima en pacientes, los niveles de taurina, glutamato y aspartato se encuentran disminuidos (21).

## GABA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El GABA fue sintetizado en 1883 y se conocía solamente como un producto metabólico de plantas y microorganismos. La existencia del GABA en el cerebro se descubrió en 1950 por Roberts y Awapara.

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro, médula espinal y retina de mamíferos. De todos los aminoácidos presentes en el cerebro, tres de los cuatro con más alta concentración (GABA, glutamina, glutamato y aspartato) se relacionan con el metabolismo del glutamato (22). Mediante numerosos estudios

bioquímicos, fisiológicos e inmunocitoquímicos se ha establecido un esquema de la amplia distribución del GABA y las enzimas que son responsables de su síntesis y degradación, así como por los estudios farmacológicos *in vitro* realizados en ratas, se logró establecer una relación entre la aparición de estados de hiperexcitabilidad, caracterizados por convulsiones de tipo epiléptico, y una disminución en la concentración de GABA en el cerebro, convirtiendo al GABA en una de las moléculas más interesantes de la neurobiología (23).

La glucosa, principal fuente de energía en el cerebro, es el principal precursor del GABA. La biosíntesis del GABA en el SNC inicia en la transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato, un intermediario en el ciclo de Krebs, produciendo glutamato. El cual es utilizado por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, EC 4.1.1.15) produciendo directamente GABA y  $\text{CO}_2$ . Esta enzima requiere del fosfato de piridoxal (PLP) como cofactor. A diferencia de otras vías multienzimáticas, la GAD es el único paso, y por consiguiente el limitante, en la vía biosintética del GABA. La GAD tiene un peso molecular de aprox. 90 000 daltons y se postula que está formada por 8 subunidades de 15 000 daltons. Esta enzima está concentrada en la porción soluble de las terminales sinápticas (sinaptoplasma), pero en presencia de  $\text{Ca}^{++}$  y de concentraciones relativamente altas de cationes monovalentes como el  $\text{K}^+$  se une a estructuras membranales (24).

Se han descrito otras vías biosintéticas del GABA en el SNC, puede ser formado a partir de la putrescina o del  $\gamma$ -hidroxibutirato, pero no existen evidencias experimentales para considerar que contribuyan significativamente en este proceso (25).

La vía degradativa primaria del GABA es a través de la transaminación con el  $\alpha$ -cetoglutarato catalizada por la enzima transaminasa del GABA (GABA-T, EC 2.6.1.19), la cual requiere de PLP como cofactor. Cataliza la transferencia del grupo amino del GABA al  $\alpha$ -cetoglutarato, formando semialdehído succínico (SSA) y glutamato. El semialdehído succínico formado es rápidamente oxidado por la deshidrogenasa del semialdehído succínico (SSA-D), formando ácido succínico, que reingresa al ciclo de Krebs (23).

La GABA-T tiene un peso molecular de 109 000 daltons y esta constituida por dos subunidades no idénticas de 53 000 y 58 000 daltons. Se localiza principalmente en las mitocondrias y tiene un pH óptimo de 8.2 (22,26).

El GABA liberado es capturado por células gliales y transaminado por la GABA-T, sin embargo, el glutamato formado no puede ser convertido a GABA ya que estas células carecen de enzima GAD, por lo que es transformado por la enzima glutámico-sintetasa (Glu-Synt) a glutamina, y de esta forma se libera al espacio intercelular donde la terminal nerviosa la incorpora, y con la glutaminasa la convierte en glutamato. De esta manera se completa el ciclo y se conserva el suministro del precursor del GABA (fig. 3) (23,25).

Existe cierta compartimentalización en el metabolismo del GABA. Hay un depósito de ácido glutámico localizado en la astrogliá, y otro en las terminales sinápticas, y es el sitio de síntesis del GABA (12).

Se ha demostrado que el GABA es liberado de las terminales sinápticas por estimulación de las fibras aferentes o por depolarización producida por una alta concentración de  $K^+$  en el medio, y que su liberación depende de  $Ca^{++}$ . Se conoce también que al impedir farmacológicamente *in vivo* la liberación de GABA de las terminales

sinápticas los animales presentan, invariablemente, convulsiones (27).

El GABA liberado interacciona con su receptor postsináptico llamado GABA<sub>A</sub>, el cual se encuentra acoplado a un canal de Cl<sup>-</sup>, que se abre (aprox. 1 mseg.) y permite la entrada de iones Cl<sup>-</sup>. Produce una hiperpolarización en la membrana postsináptica e induce de esta manera la inhibición en la respuesta de disparo (acción ionotrópica).

Diversos estudios muestran que en el receptor GABA<sub>A</sub> están acoplados sitios moduladores sobre los cuales pueden actuar ciertas drogas como la picrotóxina, que inhibe el incremento en el flujo de Cl<sup>-</sup> cerrando los canales; la bicuculina, que es un antagonista competitivo altamente selectivo que reduce la conductancia al Cl<sup>-</sup> por competición con el GABA, y las benzodiazepinas, que estimulan la acción del GABA por un incremento en la frecuencia de abertura del canal de Cl<sup>-</sup> (fig. 4) (25).

Estudios fisiológicos y de unión a receptores muestran la existencia de un segundo tipo de receptor al GABA, llamado GABA<sub>B</sub>, el cual presenta las siguientes propiedades: tiene un solo sitio de reconocimiento y de unión del GABA, que presenta características farmacológicas que contrastan marcadamente con las respuestas del receptor GABA<sub>A</sub>. Los receptores GABA<sub>B</sub> son insensibles a la bicuculina y a muchos miméticos del GABA (como la isoguvacina, el ácido 3-aminopropanosulfónico, barbitúricos y benzodiazepinas), y son estereoespecíficamente activados por el baclofén, compuesto que es inactivo en los receptores GABA<sub>A</sub>. Los receptores GABA<sub>B</sub> no están asociados a un canal de Cl<sup>-</sup>, y se postula que están acoplados a canales de Ca<sup>++</sup> y K<sup>+</sup>. Además, la unión a receptores GABA<sub>B</sub> es inhibida por la presencia de GTP o GDP, mientras que los receptores GABA<sub>A</sub> son insensibles a estos nucleótidos (25,28).

La activación de los receptores GABA<sub>A</sub> es la responsable de la clásica acción inhibitoria postsináptica del GABA. En los receptores GABA<sub>B</sub>, el GABA (o el baclofén) actúan reduciendo la liberación de otros neurotransmisores como la norepinefrina, glutamato, dopamina y serotonina, además, se postula que el receptor GABA<sub>B</sub> podría disminuir el flujo interno de Ca<sup>++</sup> a la terminal nerviosa presináptica (29).

## MODELOS EXPERIMENTALES DE CRISIS CONVULSIVAS DE TIPO EPILEPTICO

Gracias al desarrollo de diversos modelos o procedimientos experimentales que intentan reproducir los fenómenos y características mas importantes que se asocian a un tipo particular de crisis convulsiva, generalmente de tipo epiléptica, se ha generado gran cantidad de información acerca de los procesos que ocurren en el SNC, superando de esta forma la limitante natural de estudiar los procesos epilépticos en humanos (33).

Para determinar la validez de un modelo convulsivo de tipo epiléptico se toman algunos criterios como:

- 1.- Las crisis producidas deben ser recurrentes, episódicas y asociadas con un patrón electroencefalográfico anormal repetitivo de alto voltaje.
- 2.- Deberán ser controlables con antiepilépticos clínicamente efectivos.
- 3.- Los animales a utilizar deberán estar libres de otras alteraciones neurológicas (14).

La utilización de modelos experimentales de crisis convulsivas de tipo epiléptico presenta tres aplicaciones fundamentales:

a).- El ensayo de drogas anticonvulsiantes que pudieran tener una acción efectiva en la terapéutica de las crisis convulsivas en humanos.

b).- El estudio de los mecanismos neuronales básicos implicados en la generación y autosupresión de las crisis epilépticas, sean o no convulsiantes.

c).- El estudio de los mecanismos neuronales que en condiciones normales se relacionan con la regulación de la excitabilidad en el SNC y de la actividad motora. (34).

Los modelos existentes que reproducen las crisis convulsivas de tipo epiléptico se encuentran en cuatro grupos:

1.- Administración sistémica de sustancias convulsiantes (Picrotoxina, Bicuculina, Rojo de Rutenio, Pentilentetrazol, 4-Aminopiridina) (35,36).

2.- Administración tópica de sustancias irritantes (Gel de hidroxido de Aluminio, Cobalto, Penicilina, Acido Káinico, Estricnina, Acido Glutámico y Aspártico) (34,38).

3.- Estimulación eléctrica (Estímulos supramáximos o electrochoque y de baja intensidad o Kindling) (37,38,39).

4.- Modelos genéticos de epilepsia refleja (Fotosensibilidad en el babuino Papio-papio, crisis convulsivas en el gerbil Meriones unguiculatus, y sensibilidad acústica de ratones) (40,41,42,43).



## PARTICIPACION DEL GABA EN DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES DE CRISIS CONVULSIVAS

La participación del GABA en los mecanismos subyacentes al fenómeno convulsivo se ha demostrado claramente en diversos estudios en los cuales al utilizar drogas que bloquean la transmisión GABAérgica se reduce el umbral convulsivo o bien se presentan crisis, e inversamente, al utilizar drogas que facilitan este sistema de transmisión disminuyen la susceptibilidad a las crisis o las evitan.

En experimentos en los que se manipuló farmacológicamente la función del complejo Benzodiazepinas-Receptor a GABA se encontró que las benzodiazepinas, así como el fenobarbital, retardan de manera significativa el desarrollo del kindling (44), efecto que se revierte por el uso del antagonista al receptor específico a benzodiazepina CGS 8216 (45). De igual manera, cuando se administra  $\gamma$ -vinil GABA (un inhibidor de la GABA-T) también produce retardo en el desarrollo del kindling, ya que este compuesto eleva el contenido de GABA en la terminal nerviosa (46).

En los modelos de crisis por electrochoque, se encontró que al utilizar inhibidores de la GABA-T ( $\gamma$ -vinil GABA,  $\gamma$ -acetilén GABA, GABAculina, etanolamina-orto-sulfato y ácido valproico), se eleva el umbral de crisis en ratones (47).

En las crisis inducidas por compuestos convulsionantes, se ha encontrado que algunos inhibidores de la recaptura del GABA, como el ácido nipecótico y sus alquil y etil ésteres, aumentan el nivel de GABA en la terminal nerviosa e incrementan de manera importante el umbral de las crisis inducidas por pentilentetrazol (48). La

bicuculina ejerce un bloqueo de la acción del GABA en el receptor postsináptico GABA<sub>A</sub> en algunas regiones del cerebro, por lo cual produce convulsiones (49). De la picrotoxina se ha demostrado que induce crisis tónico-clónicas generalizadas por antagonismo no competitivo de los receptores, debido a su habilidad para bloquear los ionóforos activados por GABA (26).

Al estudiar una amplia variedad de compuestos que mejoran la función GABAérgica por mecanismos diferentes, se observó que ofrecen una protección potente contra las crisis convulsivas inducidas por sonido en ratones de la cepa DBA/2 (50).

El factor determinante en la disminución del GABA que acompaña a los procesos convulsivos es la disminución de la actividad de la GAD. En varios modelos experimentales en rata, ratón, conejo, perro y gato, se ha demostrado que las crisis convulsivas inducidas por: tiosemicarbazida, alta presión de Oxígeno, hidrazidas del ácido isonicotínico y del PLP, 4-desoxipiridoxina de la metionina, ácido mercaptopropiónico y alilglicina, se acompañan de una reducción de la actividad de la GAD de manera específica (27).

## CONVULSIONES INDUCIDAS CON L-GLUTAMATO MONOSODICO

La administración de L-Glutamato Monosódico (GMS) produce crisis convulsivas en ratas (51,52,53,54). Y algunos efectos son similares a aquellos producidos por la inyección intracisternal de GMS (55).

El GMS se utiliza comúnmente como aditivo en los alimentos para realzar su sabor, conocido como sazonador chino, este compuesto produce destrucción neuronal en la retina (56,57,58), y en algunas

regiones del cerebro cuando es administrado oral o paronteralmente a animales jóvenes (59). Aunque la neurotoxicidad del GMS se ha demostrado en varias especies animales, los neonatos presentan mayor susceptibilidad que los animales adultos (59,60,61,62).

Al administrar el GMS en los roedores se presentan efectos muy característicos que se dividen en dos periodos:

a) PERIODO PRECONVULSIVO O DE LATENCIA: caracterizado por quietud, un estado de somnolencia y una disminución en las respuestas normales a estímulos visuales y acústicos. Este efecto se presenta 1-2 min. después de la inyección de GMS y su duración se incrementa progresivamente con la edad de la rata.

b) PERIODO CONVULSIVO O HIPERACTIVO: caracterizado por una alta actividad motora ( giros, saltos, sacudidas , clones), producto de una actividad eléctrica cerebral exagerada (63).

Al administrar GMS en ratas se presentan cambios motores no convulsivos identificados como conductas estereotipadas, las cuales muestran patrones repetitivos de actividad motora, tales como movimientos cefálicos laterales, hiperextensión del cuello, movimientos flexoextensores del cuello, sacudidas cefálicas, actividad masticatoria, aseo cefálico, giros y locomoción continua o carrera (64).

El inicio y la intensidad de las manifestaciones motoras del periodo convulsivo inducido con GMS se encuentran en función con la

edad del animal, siendo las crisis predominantemente tónicas en ratas de 3-10 días de edad, tónico-clónicas en ratas de 60 días de edad y predominantemente clónicas en animales de 180 días de edad. (65).

Además, el patrón convulsivo es dependiente de la dosis utilizada, como ejemplo, la dosis de 4 mg/g de peso, que es suficiente en el caso de las ratas Sprague-Dawley, debe aumentarse a 5 mg/g de peso en el caso de ratas de la cepa Wistar, para reproducir fenómenos similares (66).

El patrón convulsivo del GMS presenta un efecto cronobiológico en ratas. Al administrar intraperitonealmente una dosis de 5 mg/g de peso a partir de una solución acuosa al 50 % en ratas adultas a las 7:00, 15:00 y 23:00 hr, el número de crisis por hora y sus intensidad son significativamente mayores cuando se aplica el GMS a las 7:00 hr, muriendo cerca del 70 % de los animales en status epilepticus, mientras que ningún animal muere a las 15:00 y 23:00 hr. La duración del período de latencia y convulsivo es menor a las 7:00 hr. ( $88.5 \pm 26$  min) que en el grupo de las 15:00 ( $199.4 \pm 4$  min) y 23:00 hr ( $203.5 \pm 5$  min). Estos resultados se explican como variaciones cronobiológicas en procesos fisiológicos, tanto en cerebro como en tejidos extracerebrales involucrados en el metabolismo del GMS (67).

## MECANISMO DE ACCION DEL L-GLUTAMATO MONOSODICO

El mecanismo por el cual el GMS produce actividad convulsiva es aún desconocido. Se ha demostrado que el GMS induce degeneración neuronal en la retina y en el hipotálamo en roedores y primates neonatos después de la administración oral o subcutánea (57,59). El

análisis microscópico de estas lesiones revelan que sólo las dendritas y los cuerpos celulares de neuronas intrínsecas son afectados por el GMS, mientras que las terminales nerviosas de neuronas extrínsecas o fibras mielinizadas que pasan a través del área lesionada sobreviven. (59,68). Es menos efectiva la neurotoxicidad del GMS en roedores adultos, explicándose este fenómeno como un aumento en la eficiencia de los sistemas cerebrales de inactivación del glutamato en los animales adultos comparados con los animales jóvenes (68). El aumento extracelular de glutamato origina irregularidades en la neurotransmisión glutamatérgica, presentando un efecto citotóxico, el cual produce finalmente degeneración de las células nerviosas (69).

El GMS al entrar en solución se disocia en los iones  $\text{Na}^+$  y L-Glutamato (L-Glu), y se propone que al entrar al torrente circulatorio el L-Glu no puede cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que primero es convertido a glutamina en el hígado y posteriormente ingresa al tejido neural de esta forma. Esta glutamina es captada por la neuroglía principalmente y genera un depósito intracelular del precursor inmediato del L-Glu, la cual es convertida a L-Glu por acción de la enzima glutaminasa y de esta forma es liberado al espacio intersináptico, donde induce una excitación en la célula postsináptica (53,70,71,72).

Otra alternativa de ingreso del L-Glu plantea que sea a través de regiones cefálicas que carecen del fenómeno de barrera hematoencefálica, por lo que el efecto excitatorio sería en forma directa y la lentitud característica del paso de sustancias por estas regiones carentes de barrera y su diseminación en el parénquima cerebral explicaría el período preconvulsivo o de postración y quietud inicial que caracteriza a este modelo (73).

Se ha observado el efecto que el GMS ejerce en varios sistemas de neurotransmisión al ser administrado en rata. Los niveles de catecolaminas (Dopamina y Norepinefrina) disminuyen durante los periodos preconvulsivo y convulsivo, así como los mecanismos de captura y liberación en la corteza frontal (74), y se presenta un incremento en la captura y liberación para Dopamina en el núcleo caudado (75). En el sistema GABAérgico, la actividad de la GAD aumenta significativamente durante el periodo preconvulsivo en la corteza motora, núcleo caudado, hipocampo y cerebelo, no mostrando cambios en el periodo convulsivo. La actividad de la GAD no se modifica en la sustancia negra al administrarse el GMS. (76).

## PARTICIPACION DE LA SUSTANCIA NEGRA EN LOS PROCESOS CONVULSIVOS

La base del funcionamiento del SNC es una compleja interacción de circuitos neuronales. La actividad motora se ve regulada por la interacción de los sistemas piramidales (tractos córtico-espinal y córtico medular) y extrapiramidal (que incluye los ganglios basales, núcleos talámicos y subtalámicos), por lo que el funcionamiento adecuado de los mismos es de suma importancia para evitar la actividad paroxística característica de procesos convulsivos tales como la epilepsia (77).

En los ganglios basales se encuentran varios neurotransmisores y neuromoduladores a niveles elevados (71), los cuales participan en diferentes aferencias con diferente control neuroquímico. Las aferencias dominantes provienen de la corteza cerebral, que son glutamatérgicas (o posiblemente aspartatérgicas) y son excitatorias, el

GABA predomina como inhibidor en los ganglios basales, ya que la mayoría de las neuronas en el estriado y globo pálido son GABAérgicas.

La sustancia negra debe su nombre a la gran cantidad de pigmento (melanina) que contienen sus células. Esta estructura presenta tres zonas: una lateral poco desarrollada en el hombre, una compacta y una reticular. De las zonas compacta y reticular se originan fibras nigroestriatales, que constituyen la principal conexión entre la sustancia negra y el cuerpo estriado (1).

Las neuronas GABAérgicas del estriado proyectan a las neuronas GABAérgicas del globo pálido y a la zona reticular de la sustancia negra, las cuales a su vez proyectan fuera de los ganglios basales al tálamo y al tallo cerebral. Este circuito corteza-ganglios basales-tálamo-corteza tiene como resultado final la excitación de la corteza (fig. 5) (78).

La zona reticular de la sustancia negra presenta neuronas GABAérgicas que proyectan al tálamo, colículo superior y núcleo pedúnculo pontino, la zona compacta en primates se compone de neuronas dopaminérgicas que proyectan a las zonas estriatales asociativas o sensorimotoras (79).

En el estriado existen dos series de sinapsis inhibitorias de tipo GABAérgico que inhiben a las neuronas de la sustancia negra y el globo pálido. De igual forma, el globo pálido interno y la zona reticular de la sustancia negra ejercen una fuerte inhibición sináptica en el tálamo, colículo superior y tegmento mesencefálico (80).

El estudio de la relación entre el contenido de GABA cerebral y la susceptibilidad a las crisis se ha dirigido a algunas áreas específicas cerebrales en las cuales las sinapsis GABAérgicas puedan

controlar la actividad convulsiva, por lo que la sustancia negra se ha identificado como un sitio crítico en la modulación de varios modelos de crisis convulsivas experimentales (81).

Se ha comunicado que la estimulación eléctrica de la sustancia negra tiene efectos anticonvulsivos (82), estos efectos anticonvulsivos se observaron también al aplicar una infusión intranigral de agonistas a GABA como el muscimol o  $\gamma$ -vinil GABA en varios modelos animales de crisis convulsivas (83, 84).

De las varias referencias provenientes de la sustancia negra, las proyecciones GABAérgicas al tálamo, formación reticular y/o colículo superior son las más directamente responsables en la propagación de las crisis. Evidencias experimentales no indican una participación importante de las neuronas dopaminérgicas de la zona compacta presentes en la vía nigroestriatal en el control de varios tipos de crisis sujetas a la influencia de la sustancia negra, por lo que se postula que la inhibición producida por las referencias GABAérgicas de la sustancia negra zona reticular son las responsables de suprimir la progresión de las crisis, ya que la estimulación química o eléctrica de la sustancia negra no inicia convulsiones, por lo que se postula que la actividad de crisis generada en otras áreas cerebrales puede ser amplificada o disminuida por la acción de estas referencias nigrales, ya que al realizar una lesión total de las referencias nigrales se tiene un efecto anticonvulsivo (81).



**PLANTEAMIENTO  
DEL  
PROBLEMA**

Se han realizado numerosos estudios encaminados al entendimiento de las crisis convulsivas, valiéndose de numerosos modelos experimentales que tratan de reproducir los eventos propios del fenómeno convulsivo, generalmente de tipo epiléptico. Sin embargo, hasta la fecha no se conoce con precisión el mecanismo por el cual se originan estas crisis.

El proceso de inducción de crisis convulsivas utilizando la sal Monosódica del L-Glutamato no está caracterizado totalmente, ya que se desconoce el mecanismo por medio del cual induce la aparición de crisis convulsivas, por lo que los trabajos realizados se han orientado principalmente al estudio de los mecanismos de neurotransmisión y su participación en este fenómeno convulsivo.

Tomando en consideración que el GABA es el neurotransmisor más ampliamente distribuido en el SNC de los mamíferos, tanto anatómica como funcionalmente, así como la importancia que tiene este sistema de neurotransmisión inhibitoria en la regulación del umbral convulsivo, y que el L-Glutamato es el precursor inmediato del GABA, el presente trabajo pretende conocer la influencia que esta sal ejerce en el sistema GABAérgico, principalmente en la sustancia negra, estructura con una marcada actividad regulatoria en los procesos convulsivos, a fin de conocer los posibles mecanismos que actúan en este fenómeno convulsivo.

**HIPOTESIS**

Si el GABA es uno de los principales neurotransmisores que participan en la regulación de la excitabilidad neuronal en diferentes modelos de crisis experimentales, luego entonces, la administración sistémica de la sal L-Glutamato Monosódico modifica la liberación de GABA exógeno en la sustancia negra de rata, estructuralmente en terminales GABAérgicas.

# OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la liberación neuronal de [<sup>3</sup>H] GABA exógeno en la sustancia negra de rata bajo el efecto del L-Glutamato Monosódico.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1.- Determinar la liberación de [<sup>3</sup>H] GABA exógeno en la sustancia negra después de la aplicación intraperitoneal (i.p.) de solución salina fisiológica (SSF) - GRUPO 1 -.

2.- Evaluar la liberación de [<sup>3</sup>H] GABA exógeno en la sustancia negra al momento de las crisis convulsivas, luego de la administración i.p. de GMS a una dosis única de 5 mg/g de peso - GRUPO 2 -

3.- Valorar la liberación de [<sup>3</sup>H] GABA exógeno en la sustancia negra después de la aplicación i.p. de solución de NaCl equimolar al GMS (SENaCl) - GRUPO 3 -.

**MATERIAL  
Y  
METODOS**

En el desarrollo experimental se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de dos meses de edad y con un peso de 180-250 g, las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio, esto es, con libre acceso al alimento y agua, sometidas a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas.

Se formaron tres grupos experimentales de 5 animales c/u, los cuales recibieron el tratamiento que a continuación se detalla:

GRUPO I.- Se les administro i.p. solución salina fisiologica, tomándose como grupo testigo (0.8 % NaCl).

GRUPO II.- Se les administro i.p. L-Glutamato Monosódico a una dosis única de 5 mg/g de peso corporal a partir de una solución acuosa al 50 %, (dosis a la que se induce crisis convulsivas tónico-clónicas en ratas de la cepa Wistar).

GRUPO III.- Se les administro i.p. una solución de NaCl a una concentración equimolar de Na<sup>+</sup> a la del GMS utilizado (17.3 %). Esto permitió valorar el efecto que el ión Na<sup>+</sup> pudiera tener en el mecanismo de liberación neuronal.

Los animales del grupo 2 fueron sacrificados por decapitación al momento de iniciadas las crisis convulsivas (40 ± 15 min), mientras que los grupos 1 y 3 se sacrificaron 50 min después de la inyección i.p.



## EXPERIMENTOS DE LIBERACION

Para la realización de los experimentos de liberación neuronal se utilizó el método descrito por Beas-Zárate y col (74), el cual se describe a continuación:

El cerebro se removi6 rápidamente colocándose en una solución de sacarosa 0.32 M fría (0-4°C) y se disec6 la sustancia negra de ambos hemisferios, posteriormente fueron homogeneizadas en 2 ml de medio Krebs-Bicarbonato bajo en K<sup>+</sup> (ajustado a un pH 7.4) con una mezcla de Coz-O<sub>2</sub> (5% - 95%) (tabla 1).

Se determino la pureza radioquímica del [<sup>3</sup>H] GABA antes de su utilización mediante cromatografía en papel, el cual presento un alto grado de pureza.

Para la incorporación del aminoácido marcado el homogeneizado fué preincubado a 37°C con agitación constante por 5 minutos, al término de los cuales se le agregó 40 µl de [<sup>3</sup>H] GABA (0.2 µCi, actividad específica 17.77 mCi/mmol) a una concentración final de 10 µM incubándose por 15 minutos más.

Para el proceso de liberación inducida por despolarización con K<sup>+</sup> se tomaron alícuotas de 1 ml del homogeneizado y se pasaron a un sistema de filtración donde fué lavado intensamente el tejido (13 minutos) a máxima velocidad con un medio Krebs-Bicarbonato alto en K<sup>+</sup> y carente de Ca<sup>++</sup> a 0°C (tabla 2) con la finalidad de eliminar al aminoácido no incorporado y obtener el valor basal de liberación.

Posteriormente el sistema de filtración se acondicionó a una velocidad de flujo de 500 µl/min y se aplicó al tejido el estímulo de

depolarización con un medio Krebs-Bicarbonato alto en K<sup>+</sup> (53 mM a 37 °C , el cual contiene 2.2 mM de CaCl<sub>2</sub> para inducir la liberación del aminoácido marcado (tabla 3).

En los tres medios utilizados se adicionó ácido aminooxiacético (AOAA) a una concentración de 10 μM, con la finalidad de inhibir a la enzima GABA-T, responsable de la degradación del GABA.

Se colectaron en viales fracciones cada minuto, 3 antes y hasta 10 min. después del estímulo, y el filtro correspondiente y se adicionó a cada uno 5 ml de líquido de centelleo (tritosol) y se estimó la radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman, modelo LS6000 (fig. 6).

El porcentaje de liberación de [<sup>3</sup>H] GABA en cada fracción se cálculo de la siguiente manera:

$$\% \text{ Liberación} = \frac{\text{Radioactividad liberada en 1 minuto}}{\text{Radiactividad total (R. del filtro + R. de las fracciones)}}$$

## EXPERIMENTOS DE CAPTURA

Con el propósito de esclarecer mejor el efecto producido por el GMS sobre la liberación se decidió estimar el efecto de ésta sal sobre el mecanismo de captura en el mismo tejido antes estudiado:

Primeramente se determinó el efecto del GMS in vivo en la captura, se utilizaron 18 ratas machos de la cepa wistar de dos meses de edad y con un peso de 180-250 g aprox. Se formaron 3 grupos experimentales de 6 animales cada uno:

GRUPO 1. - Se les administro i.p. solución salina fisiologica (0.8 % de NaCl).

GRUPO 2. - Se les administro i.p. L-Glutamato Monosódico (5 mg/g).

GRUPO 3. - Se les administro i.p. una solución de NaCl a una concentración equimolar de Na<sup>+</sup> a la del GMS utilizado (17.3 % de NaCl)

La sustancia negra se removió rápidamente y se homogeneizó en 500  $\mu$ l de sacarosa fría 0.32 M. Posteriormente en un vial se aplicó 2 ml de medio Krebs-bicarbonato bajo en K<sup>+</sup> (tabla 1) y 150  $\mu$ l del tejido homogeneizado, preincubándose 5 min. en un baño maria a 37 °C con agitación constante, al término del cual se aplicó 40  $\mu$ l de [<sup>3</sup>H] GABA y se incubó por 15 min. más. Finalizada la incubación se lavo intensamente el tejido utilizando medio de incubación en un sistema de filtración con la finalidad de eliminar al aminoácido marcado no incorporado, al término del cual se colectó el filtro en un vial agregando 5 ml de líquido de centelleo y se estimó la radioactividad presente. En los experimentos de captura de [<sup>3</sup>H] GABA en sustancia

negra se consideró un control a 0°C y 6 a 37°C a fin de estimar la captura inespecifica del tejido. Se determinó la concentración de proteínas en cada uno de los experimentos por el metodo de Lowry (88).

Para La valoración del efecto del GMS *in vitro* se utilizaron 6 ratas machos de la cepa Wistar con un peso de 180-250 g aprox. los cuales se sacrificaron por decapitación y se diseco la sustancia negra de ambos hemisferios, la cual se homogeneizó en 500  $\mu$ l de sacarosa 0.32 M fria. Posteriormente se aplicó en un vial 150  $\mu$ l del homogeneizado y 2 ml de medio Krebs-bicarbonato bajo en K<sup>+</sup> preincubandose por 5 min. la administración del GMS se realizó directamente en el tejido al termino del periodo de preincubación, se aplicaron 10  $\mu$ l de una solución de GMS a diferentes concentraciones (10, 50, 100, 500 y 1000  $\mu$ M.).

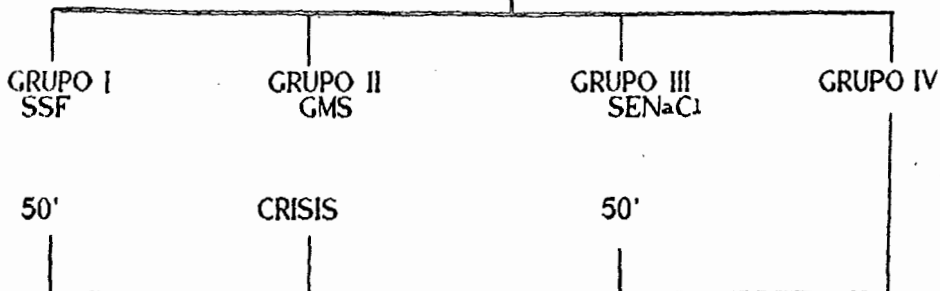
Se considero un control a 0°C y 6 a 37°C en cada una de las concentraciones aplicadas a fin de estimar la captura inespecifica del aminoácido por el tejido

El análisis estadístico de los resultados de liberación y captura se realizó aplicando las pruebas paramétricas t-student de dos colas y análisis de varianza (ANOVA) por comparación de variables independientes.

**DIAGRAMA  
EXPERIMENTAL**

RATAS MACHOS CEPA WISTAR  
180-250 GRAMOS DE PESO

TRATAMIENTO



SACRIFICIO POR DECAPITACION

DISECCION DE SUSTANCIA NEGRA

EXPERIMENTOS DE

CAPTURA

LIBERACION

CAPTURA

IN VIVO

IN VITRO

# RESULTADOS

1.- El grupo 1 (SSF) presentó un valor máximo de liberación de [<sup>3</sup>H] GABA del 6.26 % del total de radioactividad incorporada.

2.- El grupo 2 (GMS) presentó un valor máximo de liberación de [<sup>3</sup>H] GABA del 3.58 % de la radioactividad total incorporada, esto representa el 42.82 % de disminución en la liberación con respecto al grupo tratado con SSF (P < 0.05) (gráfica 1).

3.- El grupo 3 (SENaCl) presentó un valor máximo de liberación del 2.51 % de la radioactividad total incorporada, que representa una disminución del 59.90 % en la liberación de [<sup>3</sup>H] GABA con respecto al grupo tratado con SSF (P < 0.05) (gráfica 2). No se encontró diferencia significativa con respecto al grupo 2 (gráfica 3).

4.- La captura de [<sup>3</sup>H] GABA en la sustancia negra bajo efecto del GMS *in vivo* presentó un valor de captación de 0.800 pMoles/mg /15 min., que comparada con los controles de 2.389 y 2.200 pMoles/mg /15 min. para la SSF y SENaCl, representa una disminución del 66.39 % y 63.6 % respectivamente con un valor de significancia de P < 0.001 (gráfica 5).

5.- La captura de [<sup>3</sup>H] GABA en la sustancia negra bajo efecto del GMS *in vitro* no mostró cambios significativos en las concentraciones aplicadas con respecto al valor de los controles (gráfica 6).



# DISCUSSION

En los diferentes modelos de crisis convulsivas en los que se han estimado los niveles de GABA, éstos se han encontrado disminuidos ya sea en cerebro completo o en regiones discretas del mismo. Esta disminución puede estar relacionada con varios eventos como: una disminución en la actividad de la enzima que lo sintetiza, un incremento en los mecanismos de liberación, una disminución en la actividad de captación desde el medio extracelular o un aumento en su degradación, además algunas evidencias indican que la disminución en la actividad de la GAD es uno de los factores determinantes en la disminución de la transmisión GABAérgica que acompaña a los procesos convulsivos (84). En el modelo de crisis convulsivas inducidas por implantación de cobalto en corteza cerebral de rata los mecanismos de captura de [<sup>3</sup>H] GABA se presentan disminuidos en un 60 % en el tejido adyacente a la lesión (86), mientras que en el modelo de crisis convulsivas inducidas por aplicación de penicilina (10-30 mM) en la corteza cerebral de rata, la disminución en los mecanismos de liberación de GABA es mayor al 50 %, e induciendo crisis con pentilentetrazol la liberación de GABA, Glutamato, Serotonina, Acetilcolina y Noradrenalina se afecta solo a concentraciones elevadas (3.0 - 30 mM) (17) y la liberación de GABA evocada por K<sup>+</sup> en el modelo de crisis por electroshock se encontró disminuida en un 45 % en la corteza cerebral, un 50 % en hipocampo y un 75 % en el estriado, y efectos similares se observaron al aplicar el convulsionante

fluoretil (32). En los resultados obtenidos en nuestro laboratorio se encontró que la captura de [<sup>3</sup>H] GABA está disminuida en un 66.39 % cuando el GMS es administrado *in vivo* y se compara con los controles respectivos (gráfica 5). Al administrar el GMS a diferentes concentraciones en preparaciones *in vitro* se observó que no produce diferencias significativas en la captura (gráfica 6), lo cual indica que las alteraciones producidas por el GMS *in vivo* no son el resultado de un efecto directo del GMS sobre la transmisión GABAérgica en la sustancia negra, sino más bien un efecto indirecto producido a nivel de los ganglios basales específicamente en el estriado, ya que es el principal origen de terminales gabaérgicas a la sustancia negra.

Cuando se evaluó la liberación de GABA en la sustancia negra bajo efecto del GMS, se encontraron diferencias significativas tanto en los controles con solución equimolar de cloruro de sodio, como en aquellos animales tratados con GMS (gráfica 4). Es probable que la disminución de la liberación de GABA sea debida a una previa disminución en la captura ó bien a un efecto de la hiperosmolaridad producida por la alta concentración de sodio administrada, la cual pudiera alterar dicha liberación, ya que en estudios realizados por Bowman y Golztein (87) se encontró que cuando se aplican soluciones hiperosmóticas de diferentes sustancias la barrera hematoencefálica se relaja, lo cual pudiera permitir el paso de diferentes sustancias al SNC y producir alteraciones en los mecanismos de captura y liberación

neuronal. Es necesario señalar que cuando se administra solución de cloruro de sodio equimolar al GMS, se encuentra disminuida la liberación de GABA en sustancia negra, sin embargo los animales en ningún caso convulsionan. En estudios realizados por otros autores en diferentes laboratorios se ha sugerido que el efecto neuroexcitatorio del GMS es debido a la activación de receptores a glutamato diferentes al receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), los cuales promueven la entrada masiva de sodio y cloro a la terminal nerviosa e inducen la hiperexcitación característica, la cual precede a la neurotoxicidad que es mediada principalmente a través del receptor a NMDA, además el calcio parece ser un elemento importante en la inducción de este fenómeno (88).

Se ha estimado que el mayor contenido de GAD y GABA en la sustancia negra se localiza en las terminales nerviosas de proyecciones GABAérgicas provenientes del estriado (89), por lo que se postula que la actividad de estas proyecciones GABAérgicas estriadonegrales están bajo el control de interneuronas GABAérgicas en el estriado, de tal manera que un incremento en la concentración de GABA en el estriado tiende a disminuir la actividad de las proyecciones estriadonegrales y reducir la síntesis de GABA en la sustancia negra (90). En estudios previos se demostró que las proyecciones GABAérgicas negrales al núcleo pedúnculo pontino desempeñan un papel importante en la propagación de las crisis (91), y si consideramos que la sustancia negra se identifica como un sitio crítico en el cual la administración

de agonistas a GABA (como muscimol) reducen la susceptibilidad a las crisis inducidas por bicuculina, pentilentetrazol, fluoretil, kindling de amígdala y crisis audiogénicas, y que la habilidad de estos agentes GABAérgicos para proteger contra las crisis en el modelo de electroshock máximo se correlaciona directamente con el aumento de GABA específicamente en las terminales nerviosas de la sustancia negra (82). Se puede inferir que la aplicación de agentes convulsionantes que actúan en el sistema GABAérgico de la sustancia negra, participan directamente en la regulación de la actividad paroxística inducida experimentalmente. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el GMS modifica significativamente el sistema GABAérgico (aunque de manera indirecta) en esta región cerebral al alterar los mecanismos de captura y liberación, resultados que se correlacionan con los obtenidos previamente con otros modelos experimentales de crisis convulsivas.

Se postula que en el desarrollo de los procesos convulsivos las aferencias GABAérgicas a sustancia negra inhiben a las neuronas eferentes de la zona reticulata que proyectan al tálamo, formación reticular y/o colículo superior y que son las más directamente relacionadas en la propagación de las crisis ya que la estimulación eléctrica o química de la sustancia negra no inicia convulsiones, por lo que la actividad de crisis generada en otras áreas cerebrales puede ser amplificada o disminuida por este grupo de eferencias negales (92).

Estudios futuros en los cuales se valore los mecanismos de captura y liberación de GABA bajo el efecto del GMS en estructuras como el estriado, globo palido, tálamo, colículo superior, y formación reticular, así como el estudio simultáneo de otros neurotransmisores como el glutamato y las catecolaminas permitirán establecer la participación real de la sustancia negra en los procesos convulsivos, así como la importancia que el sistema GABAérgico desempeña en la regulación de la excitabilidad neuronal.

# CONCLUSIONES

1.- El GMS ejerce una disminución en la captura y liberación del GABA en sustancia negra, lo cual pudiera facilitar el desarrollo de las crisis convulsivas.

2.- El mecanismo por el cual el GMS modifica la captación y liberación del GABA en la sustancia negra no se conoce aún, por lo que será necesario implementar nuevos estudios que permitan conocer si el efecto característico se produce a nivel de receptores a GABA en sustancia negra ó a través de vías de neurotransmisión específicas que se asocian a la sustancia negra.

3.- La participación del ión  $\text{Na}^+$  en los mecanismos de captura y liberación de GABA deberá evaluarse ampliamente, a fin de conocer con exactitud su papel fisiológico en la neurotransmisión GABAérgica.



# BIBLIOGRAFIA

01. López Antúnez, L. (1983). "ANATOMIA FUNCIONAL DEL SISTEMA NERVIOSO". Edit. Limusa. México. pp. 27-110, 417-436.
02. Barr, M. L. (1979). "THE HUMAN NERVOUS SYSTEM. AN ANATOMIC VIEWPOINT". 3rd. edition. Harper International Edition. U.S.A. pp. 3-23, 417-436.
03. Gershon, M. D.; Schwartz, J. H. and Kandel, E. R. (1981). "MORPHOLOGY OF CHEMICAL SYNAPSES AND PATTERNS OF INTERCONNECTION". in: Principles Of Neural Sciences. Kandel, E.R. and Schwartz, J.H. (eds). Elsevier/North-Holland. cap. 9 pp. 91-105.
04. Hall, Z. W. (1972). "RELEASE OF NEUROTRANSMITTERS AND THEIR INTERACTION WITH RECEPTORS". Ann Rev. Physiol. pp. 925-952.
05. Katz, B. and Miledi, R. (1969). J. Physiol 203: 459-487 y 689- 706. Citada en : Ann Rev. Physiol. (1972). Hall, Z.W., Release Of Neurotransmitters And Their Interaction With Receptors. pp. 81-90, 925-952.
06. Iversen, L. L. (1970). "NEURAL UPTAKE PROCESSES FOR AMINES AND AMINO ACIDS". Adv. Biochem. Psychopharmacol. 2:109-132.
07. Noback, C. R. and Demarest, R. J. (1980). "SISTEMA NERVIOSO HUMANO. FUNDAMENTOS DE NEUROBIOLOGIA". McGraw-Hill, México. pp. 313-337.
08. Bloom, E. F. (Ed)(1972). "AMINO ACIDS AND POLYPEPTIDES IN NEURONAL FUNCTION". Neurosci. Res. Prog. Bull 10: 127-251.
09. Tapia, R. and Arias, C. (1981). "CALCIUM TRANSPORT AND THE RELEASE OF NEUROTRANSMITTERS: EFFECTS OF DRUGS IN VIVO E IN VITRO" en: Regulatory Mechanisms Of Synaptic Transmission. Tapia, R y Cotmann C. W. (Eds). Plenum Press New York. pp.

10. Narahashi, T. (1974). "CHEMICALS AS TOOLS IN THE STUDY OF EXCITABLE MEMBRANES". *Physiol. Rev.* 54: 813-889.
  
11. Tapia, R. (1983). "ESTUDIOS NEUROQUIMICOS DE LA FUNCION DE LA MEMBRANA NEURONAL EN LA TRANSMISION SINAPTICA". en : *Mensaje Bioquimico*, UNAM. México, D.F. Vol VI. pp. 1-20.
  
12. Pasantés M. E. and Arechiga H. (1983). "AMINOACIDOS Y PEPTIDOS EN LA INTEGRACION DE FUNCIONES NERVIOSAS". *Biblioteca de Ciencias*, UNAM. México. D.F. Cap. 1 pp. 19-29.
  
13. Gastaut, H. and Broughton, R. (1972). "EPILEPTIC SEIZURES. CLINICAL AND ELECTROGRAPHIC FEATURES, DIAGNOSES AND TREATMENT". Charles C. Thomas, Springfield. pp. 276-282.
  
14. Otero, E. (1985). "NEUROQUIMICA" en: *Epilepsia, Principios y Práctica*. Marcos Velasco (Ed). Cap VI. pp. 89-97.
  
15. Pedata, F.; Mulas, A.; Marconcini, P. I. and Pepeau, G. (1976). "CHANGES IN REGIONAL BRAIN ACETYLCHOLINE LEVELS DURING DRUG INDUCED CONVULSIONS". *Eur. J. Pharmacol.* 40: 329-335.
  
16. Celesia, G. G. and Jasper, H. H. (1968). "ACETYLCHOLINE RELEASED FROM CEREBRAL CORTEX IN RELATIONS TO STATE OF ACTIVATION". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224: 398-403.
  
17. Yash, T. L. and Yamamura, H. I. (1975). "THE RELEASE IN VIVO OF [<sup>3</sup>H]ACETYLCHOLINE FROM RAT CAUDATE NUCLEUS AND CEREBRAL CORTEX BY ATROPINE PENTYLENTETRAZOL K<sup>+</sup> DEPOLARIZATION AND ELECTRICAL STIMULATION". *J. Neurochem.* 25: 123-130.

18. Iversen, L. L.; Iversen, S. D. and Snyder, S. H. (1975). "BIOCHEMISTRY OF BIOGENIC AMINES". Handbook Of Psychopharmacology 3. Plenum Press. Nueva York. pp. 1023-1029.
19. Beas, Z. C. y Feria, V. A. (1985). "BASES MOLECULARES". en: Epilepsia, Principios Y Práctica. Marcos Velasco (Ed). Cap. VII. pp. 99-120.
20. Batist.in, L. M. ; Varotto and De Lorenzi, A. (1976). "AMINOACID UPTAKE IN VIVO BY THE MOUSE BRAIN AND BY VARIOUS REGIONS OF THE RABBIT BRAIN AFTER DRUG-INDUCED CONVULSIONS". Brain Res. 89: 215-224.
21. Van Gelder, N. M.; Sherwin, A L. and Rassamussen, T. (1972). "AMINOACID CONTENT OF EPILEPTOGENIC HUMAN BRAIN. FOCAL VERSUS SURROUNDING REGIONS". Brain Research. 40: 385-389.
22. Perry, T. L.; Berry, K.; Hansen, S.; Diamond, S. and Mok, C. (1971). "REGIONAL DISTRIBUTION OF AMINO ACIDS IN HUMAN BRAIN OBTAINED AT AUTOPSY". J. Neurochem. 18: 513-519.
23. Tapia, R. (1983). "EL ACIDO GAMMA AMINOBUTIRICO". en: Aminoácidos Y Péptidos En La Integración de Funciones Nerviosas. Pasantes Morales, E. y Aréchiga, H. UNAM. México. pp. 57-70.
24. Covarruvas, M. and Tapia, R. (1978). "CALCIUM-DEPENDENT BINDING OF BRAIN GLUTAMATE DECARBOXILASE TO PHOSPHOLIPID VESICLES". J. Neurochem. 31: 1209-1214.
25. Siegel, G.; Agranoff, B.; Albers, R. W. and Molinoff, P. (1989). "BASIC NEUROCHEMISTRY". 4th. Edition. Raven Press, New York. pp. 313.

26. Cooper, J. R.; Bloom, E. F. and Roth, R. H. (1982). "THE BIOCHEMICAL BASIS OF NEUROPHARMACOLOGY". 4th. Edition. Oxford University Press. U.S.A. pp. 249-294.
27. Tapia, R. (1980). "CONVULSIONS AND THE FUNCTION OF GABAERGIC SYNAPSIS". en: Neurochemistry and Clinical Neurology. Alan R. Liss Inc. U.S.A. pp. 123-131.
28. McGeer, P. L. and McGeer, E. L. (1989). "AMINO ACIDS NEUROTRANSMITTERS. en: Siegel, G. J.; Agranoff, b. W.; Albers, R. W. y Molinoff, P. B. (Eds). 4th. Edition. Raven Press, New York. pp. 311-332.
29. Stevens, C. F. (1981). "CHANNEL FAMILIES IN THE BRAIN". Nature. 290: 110-152.
30. Green, A. R.; Metz, A.; Minchin, M. C. W. and Vincent, N. D. (1987a). "INHIBITION OF THE RATE OF GABA SYNTHESIS IN REGIONS OF RAT BRAIN FOLLOWING A CONVULSION". Br. J. Pharmacol. 92: 5-11.
31. Green, A. R.; Minchin, M. C. W. and Vincent, N. D. (1987b). "INHIBITION OF GABA RELEASE FROM SLICES PREPARED FROM SEVERAL BRAIN REGIONS OF RATS AT VARIOUS TIMES FOLLOWING A CONVULSION". Br. J. Pharmacol. 92: 13-18.
32. Baumann, P. A.; Wicki, P.; Stierlin, C. and Waldmeier, P. C. (1990). "INVESTIGATIONS ON GABA<sub>A</sub> RECEPTOR-MEDIATED AUTOINHIBITION OF GABA RELEASE". Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 341: 88-93.
33. Purpura, D. P.; Penry, J. K.; Tower, D.; Woodbury, D. M. and Walter, R. (1972). "EXPERIMENTAL MODELS OF EPILEPSY" (Eds). Raven Press. Nueva York. pp. 7-8.

34. Solis, O. H.; y Arauz, C. J. (1986). "MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA". en: *Epilepsia, Un Enfoque Multidisciplinario*. Feria V. A.; Martínez De Muñoz, D. y Rubio-Donnadieu, F. Edit. Trillas, S.A. México, D.F. Cap. 3. pp. 74-97.
35. Stone, W. E. (1972). "SISTEMIC CHEMICAL CONVULSANTS AND METABOLIC DERANGEMENTS" en: Purpura, D.P., Penry, J.K., Tower, D., Woodbury, D.M. y Walter, R. (Eds): *Experimental Models Of Epilepsy*, Cap. 18, Raven Press, New York. 407-432.
36. Kopeloff, L. M. (1960). "EXPERIMENTAL EPILEPSY IN THE MOUSE", *Proc. Soc. Explt. Biol. Med.*, 104: 500-504.
37. Swinyard, E. A. (1972). "ELECTRICALLY INDUCED CONVULSIONS" en: Purpura, D. P.; Penry, J. K.; Tower, D.; Woodbury, D. M. y Walter, R. (Eds.) *Experimental Models Of Epilepsy*, Cap. 17, Raven Press, New York, pp. 433-438.
38. Goddard, G. V.; Mc Intyre, D. C. and Leech, D. K. (1969). "A PERMANENT CHANGE IN BRAIN FUNCTIONS RESULTING FROM BRAIN DAILY ELECTRICAL STIMULATION" *Exper. Neurol.* 25: 295-330.
39. Killam, K. F.; Killam, E. K. and Naquet, R. (1967). "AN ANIMAL MODEL OF LIGHT SENSITIVE EPILEPSY". *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 22: 497-513.
40. Roberts, R. C.; Ribak, C. E. and Oertel, W. H. (1985). "INCREASED NUMBER OF GABAERGIC NEURONS OCCUR IN THE INFERIOR COLLICULUS OF AN AUDIOGENIC MODEL OF GENETIC EPILEPSY". *Brain Research.* 311: 324-338.
41. Hjesen, D. L.; Frank, J. E. and Amend, D. L. (1987). "ONTOGENY OF SEIZURE INCIDENCE, LATENCY AND SEVERITY

IN GENETICALLY PRONE EPILEPTIC RATS". Develop. Psychobiol.  
21: 355-363.

42. Seyfried, I. N. and Glaser, G. H. (1985). "A REVIEW OF MOUSE MUTANTS AS A GENETIC MODEL OF EPILEPSY". Epilepsia.  
26: 143-150.

43. Loskota, W. J.; Lomax, P. and Rich, S. T. (1974). "THE GERBIL AS A MODEL FOR THE STUDY OF EPILEPSIES". Epilepsia.  
15: 109-110.

44. Kalichman, M. W.; Livigston, K. E. and Burnham, W. M. (1981). "PHARMACOLOGICAL INVESTIGATION OF  $\gamma$ -AMINO BUTYRIC ACID (GABA) AND THE DEVELOPMENT OF AMYGDALA-KINDLED SEIZURES IN THE RAT". Exp. Neurol, 74: 829-836.

45. Robertson, H. A.; Rives, M.; Black, D. A. S. and Peterson, M. R. (1984). "A PARTIAL AGONIST AT THE ANTICONVULSANT BENZODIACEPINE RECEPTOR: REVERSAL OF THE ANTICONVULSANT EFFECTS OF RO15-1780 WITH CGS-8216". Brain. Res. 291: 388-390.

46. Shin, C.; Legg, S.; and McNamara, J. O. (1984). "SYSTEMIC  $\gamma$ -VINYL-GABA RETARDS KINDLING DEVELOPMENT AND SUPPRESSES KINDLED SEIZURES". Neurosci. Abst. 10: 343.

47. Iadarola, M. J. and Gale, K. (1982). "SUBSTANTIA NIGRA: SITE OF ANTICONVULSANT ACTIVITY MEDIATED BY  $\gamma$ -AMINO BUTYRIC ACID". Science. 218: 1237-1240.

48. Frey, H. H.; Popp, C. and Loscher, W. (1979). "INFLUENCE OF INHIBITOR OF THE HIGH AFFINITY GABA UPTAKE ON SEIZURE THRESHOLDS IN MICE". Neuropharmacol. 18: 581-590.

49. Johnston, G. A. R. (1978). "NEUROPHARMACOLOGY OF AMINO ACID INHIBITORY TRANSMITTER". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18: 269-289.
50. Chapman, A. G.; Croucher, M. I. and Meldrum, B. S. (1984). "EVALUATION OF ANTICONVULSANT GRUGS IN DBA/2 MICE WITH SOUND INDUCED SEIZURES". *Arzheim-Forrsh.* 34: 1261-1264.
51. Bhagavan, H. N.; Coursin, D. B. and Stewart, C. N. (1971). "MONOSODIUM GLUTAMATE INDUCE CONVULSIVE DISORDERS IN RATS". *Nature. Lond.* 232: 275-276.
52. Johnston, G. A. R. (1973). "CONVULSIONS INDUCED IN 10-DAY-OLD RATS BY INTRAPERITONEAL INJECTION OF MONOSODIUM GLUTAMATE AND RELATED EXCITANT AMINO ACIDS". *Biochem. Pharmacol.* 22:137-140.
53. Mushaward, I. K. and Koeppé, R. R. (1971). "THE TOXICITY OF MONOSODIUM GLUTAMATE IN YOUNG RATS". *Biochem. biophys. Acta.* 244: 318-321.
54. Stewart, C. N.; Coursin, D. B. and Bhagavan H. N. (1972). "ELECTROENCEPHALOGRAPHIC STUDY OF L-GLUTAMATE INDUCED SEIZURES IN THE RATS". *Toxic. Appl. Pharmac.* 23: 635-639.
55. Wiechert, P. and Herbst, A. (1966). "PROVOCATION OF CEREBRAL SEIZURES BY DERANGEMENT OF THE NATURAL BALANCE BETWEEN GLUTAMIC ACID AND GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID". *J. Neurochem.* 13: 59-64.
56. Karlsen, R. L. and Fonnum, F. (1976). "THE TOXIC EFFECT OF SODIUM GLUTAMATE ON RAT RETINA: CHANGES IN PUTATIVE TRANSMITTERS AND THEIR CORRESPONDING ENZYMES". *J. Neurochem.* 27: 1437-1441.



57. Lucas, D. E. and Newhouse, J. P. (1957). "THE TOXIC EFFECT OF SODIUM L-GLUTAMATE ON THE INNER LAYERS OF THE RETINA". *Archs. Ophthal.* 58: 193-201.
58. Olney, J. W. (1969b). "BRAIN LESIONS, OBESITY AND OTHER DISTURBANCES IN MICE TRATED WITH MONOSODIUM GLUTAMATE". *Science.* 164: 719-721.
59. Everly, J. L. (1971). "LIGHT MICRSCOPIC EXAMINATION OF MSG-INDUCED LESIONS IN BRAIN OF FETAL AND NEONATAL RATS". *Anat. Rec.* 169: 312.
60. Arees, E. and Mayer, J. (1972). "MONOSODIUM GLUTAMATE-INDUCED BRAIN LESIONS: ELECTRON MICROSCOPIC EXAMINATION. *Science.* 170: 549-550.
61. Burde, R. M.; Schainker, B. and Kayes, J. (1971). "ACUTE EFFECT OF ORAL AND SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION MONOSODIUM GLUTAMATE ON THE ARCUATE NUCLEUS OF HIPOTHALAMUS IN MICE AND RATS". *Nature. Lond.* 233: 58-60.
62. Olney, J. W. and Sharpe, L. G. (1969). "BRAIN LESIONS IN AN INFANT RHEBUS MONKEY TRATED WITH MONOSODIUM GLUTAMATE". *Science.* 166: 386-388.
63. Feria, V. A.; Martínez de M., D. y Rubio, D. F. (1986). "EPILEPSIA, UN ENFOQUE MULTIDISCIPLINARIO". Ed. Trillas, S.A. Primera Edición, pp.74-97.
64. Arauz, C. J.; Cuevas, A. L.; Palomera, CH. A.; Quirarte, G. y Feria, V. A. (1985). "CONDUCTAS ESTEREOTIPADAS PROVOCADAS POR GLUTAMATO MONOSODICO EN RATAS Y RATONES". XXVIII CONG. NAC. CIEN. FISIOL. 204. pp. 202.

65. Arauz, C. J. and Feria, V. A. (1984). "MONOSODIUM L-GLUTAMATE-INDUCED CONVULSIONS I. DIFFERENCES IN SEIZURE PATTERN AND DURATION OF EFFECT AS A FUNCTION OF AGE IN RATS". *Gen. Pharmac.* 5: 391-395.
66. Arauz, C. J.; Cuevas, A. L. y Feria, V. A. (1982). "DIFERENCIAS EN EL EFECTO NEUROEXCITATORIO DEL L-GLUTAMATO MONOSODICO EN DIVERSOS ROEDORES". XXV CONG. NAC. CIEN. FISIOL. pp. 54.
67. Gutierrez, P. R.; Alfaro, F.; Tapia, A. G. y Feria, V. A. (1988). "ESTUDIO CRONOBIOLOGICO DEL EFECTO CONVULSIVO DEL GLUTAMATO MONOSODICO ADMINISTRADO A RATAS ADULTAS". XXXI CONG. NAC. CIEN. FISIOL. M16.
68. Olney, J. W. (1971). "GLUTAMATE-INDUCED NEURONAL NECROSIS IN THE INFANT MOUSE HIPOTHALAMUS. AN ELECTRONMICROSCOPIC STUDY". *J. Neurophat. Exp. Neurol.*, 30: 75-90.
69. Schwarcz, R.; Kohler, Ch.; Mangano, R and Neophytides, A. N. (1980). "GLUTAMATE INDUCED NEURONAL DEGENERATION: STUDIES ON THE ROLE OF GLUTAMATE RE-UP TAKE". en: G. Di Chiara y G. L. Gessa (Eds). *Glutamate as a neurotransmitter*. Raven Press, Nueva York.
70. Stegin, L. D.; Brummel, M. C.; Boaz, D. P. and Filler, L. J. Jr. (1973). "MONOSODIUM GLUTAMATE METABOLISM IN THE NEONATAL PIG. CONVERSION OF ADMINISTERED GLUTAMATE INTO OTHER METABOLITES IN VIVO". *J. Nutr.* 103: 1146-1154.
71. Oldendorf, W. H. (1971). "BRAIN UPTAKE OF RADIOLABELED AMINOACIDS. AMINES AND HEXOSES AFTER ARTERIAL INJECTION". *Am. J. Physiol.* 221: 1629-1639.

72. Martinez, H. A.; Bell, K. P. and Norenberg, M. D. (1977). "GLUTAMINE SYNTHETASE: GLIAL LOCALIZATION IN BRAIN". *Science*. 195: 1356-1358.
73. Roberts, E. (1981). "STRATEGIES FOR IDENTIFYING SOURCES AND SITES OF FORMATION OF GABA-PRECURSOR OR TRANSMITTER GLUTAMINE IN BRAIN". en: *Glutamate As A Neurotransmitter*. Di Chiara, G. y Gessa, G. L. (Eds.) Raven Press, Nueva York. 27: 91-102.
74. Beas, Z. C. ; Arauz, C. J. ; Velazquez, A. and Feria, V. A. (1985). "MONOSODIUM L-GLUTAMATE INDUCED CONVULSIONS-II. CHANGES IN CATECHOLAMINE CONCENTRATIONS IN VARIOUS BRAIN AREAS OF ADULT RATS". *Gen. Pharmacol.* 16: 489-493.
75. Beas, Z. C. ; Schliebs, R. ; Morales, V. A. and Feria, V. A. (1989). "MONOSODIUM L-GLUTAMATE INDUCED CONVULSIONS: CHANGES IN UPTAKE AND RELEASE OF CATECHOLAMINES IN CEREBRAL CORTEX AND CAUDATE NUCLEUS OF ADULT RATS". *Epilepsy Res.* 4: 20-27.
76. Morales, V. A.; Medina C. L. G.; Beas, Z. C.; Feria V. A. y Del Angel, M. A. R. (1990). "DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE DESCARBOXILASA DE ACIDO GLUTAMICO BAJO EFECTO DEL GLUTAMATO MONOSODICO". XXXIII CONG. NAC. CIEN. FISIOL. C191.
77. Noback, R. Ch. y Demarest, J. R. (1980). "SISTEMA NERVIOSO HUMANO. FUNDAMENTOS DE NEUROBIOLOGIA". Ed. Mc Graw Hill. México, D.F. pp. 318-321.
78. Graybiel, M. A. (1990). "NEUROTRANSMITTERS AND NEUROMODULATORS IN THE BASAL GANGLIA". *Rev. Trends In Neurosciences.* 13: 7 ,pp. 244-254.

79. Parent, A. (1990). "EXTRINSIC CONNECTIONS OF THE BASAL GANGLIA". Trends. 13: 254-258.
80. Chevalier, G. and Deniau, J. M. (1990). "DESHINIBITION AS A BASIC PROCESS IN THE EXPRESSION OF STRIATAL FUNCTIONS". Trends. 13: 277-280.
81. Gale, K. (1986). "ROLE OF THE SUBSTANTIA NIGRA IN THE GABA-MEDIATED ANTICONVULSANT ACTIONS". Adv. In Neurobiol. 44: 343-364.
82. Amato, G.; Sorbera, F. and La Grutta, V. (1981). "THE ROLE OF THE SUBSTANTIA NIGRA IN THE CONTROL OF AMIGDALOID PAROXYSMAL ACTIVITY". Arch. Int. Physiol. Biochem. 89: 91-95.
83. Morimoto, K. and Goodard, G. V. (1987). "THE SUBSTANTIA NIGRA IS AN IMPORTANT SITE FOR THE CONTAINMENT OF SEIZURE GENERALIZATION IN THE KINDLING MODEL OF EPILEPSY". Epilepsia. 28:(1) 1-10.
84. Meldrum, B. S. (1975). "EPILEPSY AND  $\gamma$ -AMINO BUTYRIC ACID-MEDIATED INHIBITION". Int. Rev. Neurobiol. 17: 1-36.
85. Lowry, O.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). "PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT". J. Biol. Chem. 193: 265-275.
86. Stephen, M. R. and Craig, R. Ch. (1981). "STUDIES ON  $\gamma$ -AMINO BUTYRIC ACID TRANSPORT IN COBALT EXPERIMENTAL EPILEPSY IN THE RAT". Journal Of Neurochemistry. 36:(3) 1006-1011.

87. Bowman, D. P.; Glodstein, G. W.; Dorovini-zis, K. and Betz, L. (1984). "HIPEROSMOTIC ARABINOSE SOLUTIONS OPEN THE TIGHT JUNCTIONS BETWEEN BRAIN CAPILLARY ENDOTHELIAL CELLS IN TISSUE CULTURE". Brain Research. 302: 383-386.
88. Frandsen A.; Drejer, J. and Schousboe, A. (1989a). "DIRECT EVIDENCE THAT EXCITOTOXICITY IN CULTURED NEURONS IS MEDIATED VIA N-METHYL-D-ASPARTATE (NMDA) AS WELL AS NON-NMDA RECEPTORS". J. Neurochem. 53: 297-299.
89. Gale, K. and Casu, M. (1981). "DINAMIC UTILIZATION OF GABA IN SUBSTANTIA NIGRA: REGULATION BY DOPAMINE AND GABA IN THE STRIATUM, AND ITS CLINICAL AND BEHAVIORAL IMPLICATIONS". Mol. Cell. Biochem. 39: 369-405.
90. Löscher, W.; Hönack, D. and Grammer, M. (1989). "USE OF INHIBITORS OF  $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID (GABA) TRANSAMINASE FOR THE ESTIMATION OF GABA TURNOVER IN VARIOUS BRAIN REGIONS OF RATS: A REEVALUATION OF AMINOOXIACETIC ACID". Journal Of Neurochemistry. 53:1737-1750.
91. Okada, R.; Negishi, N. and Nagaya, H. (1989). "THE ROLE OF THE NIGROTEGMENTAL GABAERGIC PATHWAY IN THE PROPAGATION OF PENTYLENTETRAZOL-INDUCED SEIZURES". Brain Research. 480: 383-387.
92. Garant, D. S. and Gale, K. (1985). "INFUSION OF OPIATES INTO SUBSTANTIA NIGRA PROTECTS AGAINST MAXIMAL ELECTROSHOCK SEIZURES IN RATS". J. Pharmacol. Exp. Therap. 234: 45-48.

TABLAS  
Y  
FIGURAS

TABLA 1

MEDIO KREBS-BICARBONATO CON BAJA CONCENTRACION DE  $K^+$   
 UTILIZADO EN LA CAPTURA DE [ $^3H$ ]GABA

REACTIVO	CONCENTRACION
NaCl .....	110 mM
KCl .....	3 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	1.2 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1.2 mM
NaHCO <sub>3</sub> .....	25 mM
CaCl <sub>2</sub> .....	1.5 mM
GLUCOSA .....	10 mM

TABLA 2

MEDIO KREBS-BICARBONATO LIBRE DE  $Ca^{++}$  UTILIZADO PARA ESTIMAR LA  
LIBERACION BASAL DE  $^{199}H$  GABA

REACTIVO	CONCENTRACION
NaCl .....	115 mM
KCl .....	3 mM
MgSO <sub>4</sub> .....	1.2 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1.2 mM
NaHCO <sub>3</sub> .....	25 mM
GLUCOSA .....	10 mM
EGTA .....	1 mM



TABLA 3

MEDIO KREBS-BICARBONATO UTILIZADO EN LA LIBERACION DE  
 [3H] GABA ESTIMULADA POR ALTA CONCENTRACION DE  $K^+$  Y  $Ca^{++}$

REACTIVO	CONCENTRACION
NaCl .....	62 mM
KCl .....	53 mM
MgSO <sub>4</sub> .....	1.2 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1.2 mM
NaHCO <sub>3</sub> .....	25 mM
CaCl <sub>2</sub> .....	2.2 mM
GLUCOSA .....	10 mM

FIGURA 1  
SINAPSIS ELECTRICA

Representación esquemática de una sinapsis eléctrica en la cual se muestra el modelo tridimensional de los conexones (CO), formados por seis subunidades de conexinas (C). Las flechas señalan la comunicación entre el citoplasma de una neurona con el de la contigua cuando la sinapsis se encuentra eléctricamente acoplada. E = espacio intersináptico; M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> = bicapas de fosfolípidos de las membranas plasmáticas de las neuronas en contacto.

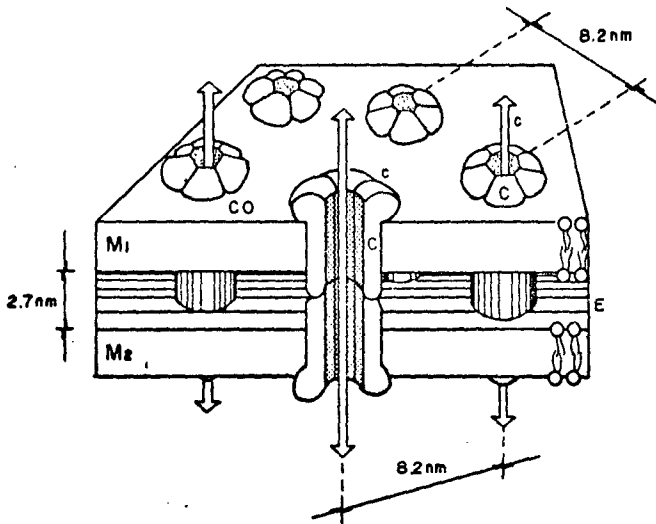


Fig. 1

## FIGURA 2

### ESQUEMA FUNCIONAL DE LA SINAPISIS QUIMICA

En la presinapsis se encuentran los sistemas de almacenamiento del transmisor que puede realizarse tanto en las vesículas sinápticas como en el citoplasma, y los mecanismos responsables de la liberación del transmisor, los cuales se activan cuando la concentración interna de  $Ca^{++}$  se incrementa, ya sea por la llegada de un potencial de acción o por la actividad de los sistemas que controlan la concentración interna de  $Ca^{++}$ , como las mitocondrias o el retículo endoplásmico. Una vez liberado el transmisor interacciona con su receptor postsináptico específico y dependiendo de su naturaleza origina cambios en la permeabilidad iónica de la membrana postsináptica. El transmisor es inactivado por acción enzimática o reaccumulado por la presinapsis a través de un sistema de transporte de alta afinidad.

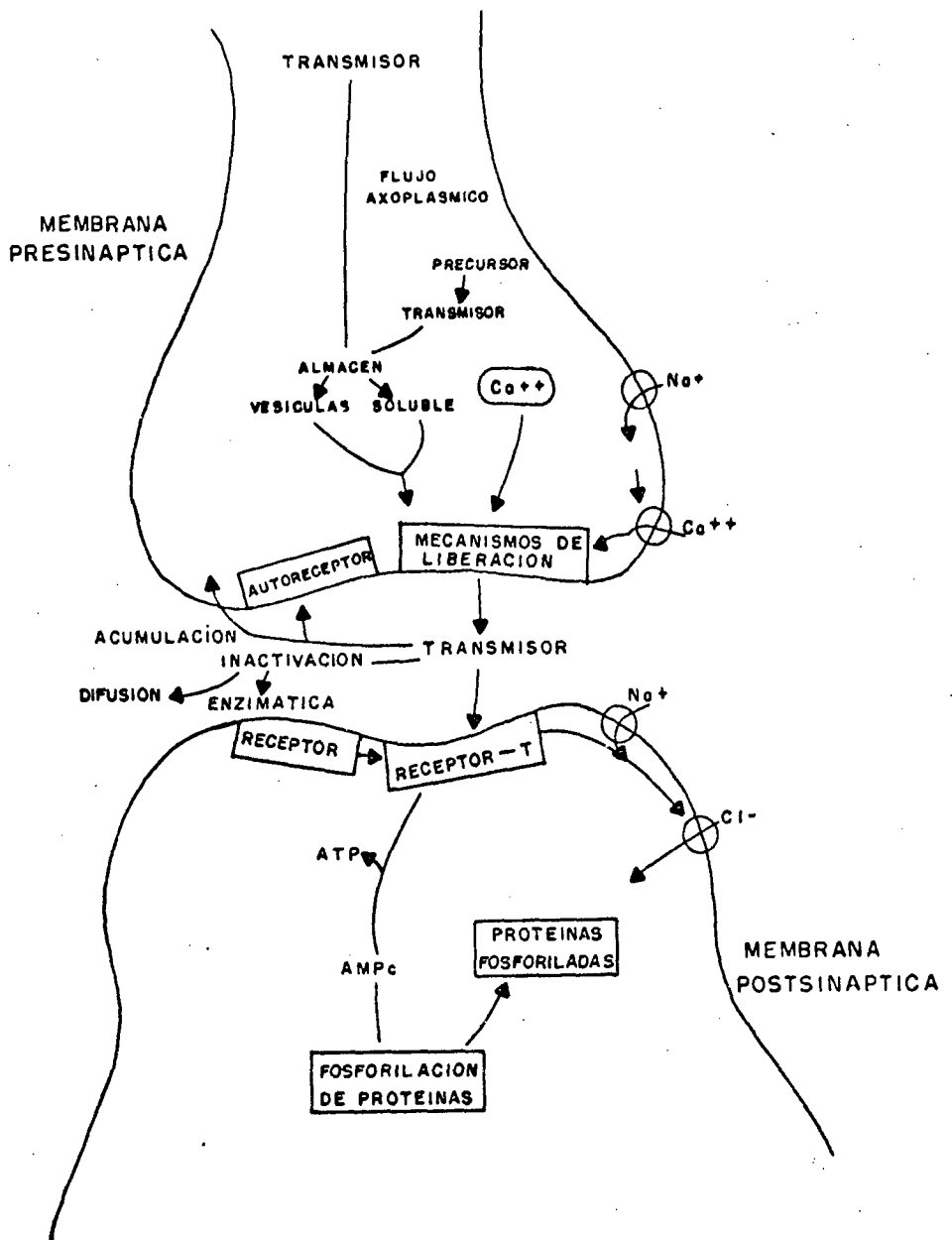


Fig. 2

### FIGURA 3

Diagrama esquemático en el cual se observa la relación existente entre una terminal nerviosa GABAérgica, un proceso postsináptico y una célula glial. Las enzimas se encuentran en negro y los intermediarios endógenos en rectángulos blancos. abreviaciones: DAG = Descarboxilasa Del Acido Glutámico; GABA = Acido  $\gamma$ -Amino Butirico; GABA-T = Transaminasa del GABA; DHSS= Deshidrogenasa Del Semialdehido Succínico; SINTESIS GLU = Glutamino- Sintetasa.

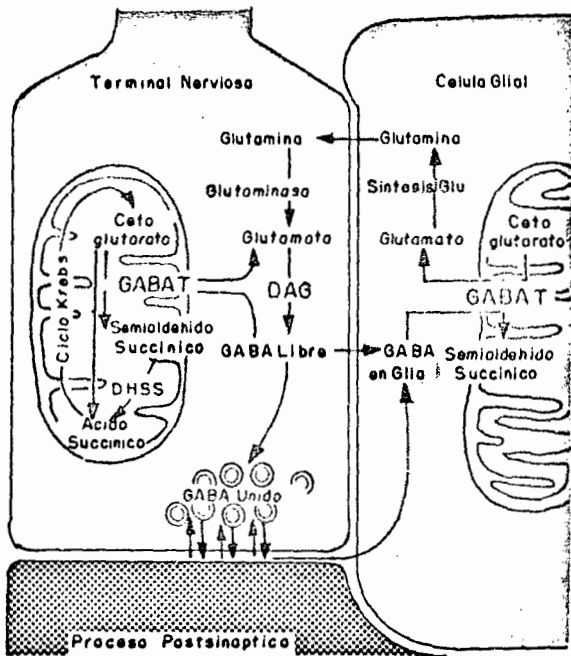


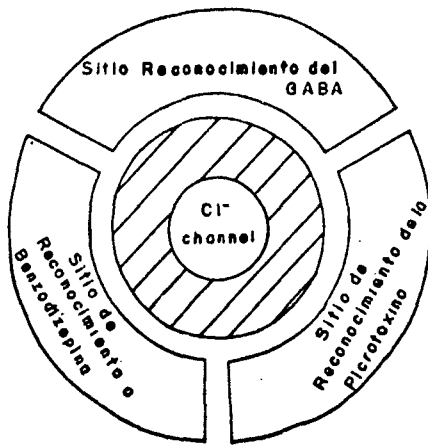
Fig. 3

#### FIGURA 4

#### MODELO TEORICO DEL RECEPTOR A GABA

En este modelo teorico del complejo ionoforo-receptor a GABA se postulan tres sitios de union: un sitio de reconocimiento al GABA, un sitio de reconocimiento a benzodiazepinas (anticonvulsionantes) y un sitio de reconocimiento a picrotoxina (convulsionantes). El canal a  $\text{Cl}^-$  puede existir separado o unido a los sitios de reconocimiento. El modelo propone que la función del GABA (apertura del canal a  $\text{Cl}^-$ ) puede ser modulada a nivel del sitio de reconocimiento a picrotoxina y a benzodiazepinas, o en ambos. El efecto puede ser positivo (aumento en la inhibición por GABA), o negativo (disminución en la inhibición por GABA) a través del complejo ionoforo GABA- $\text{Cl}^-$



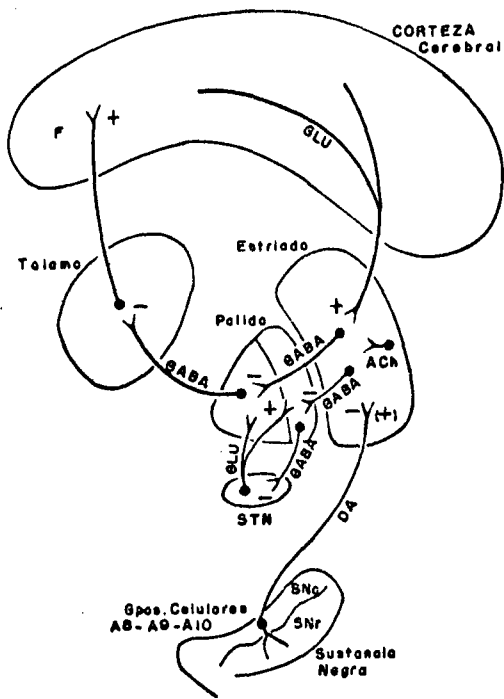


**Fig 4**

## FIGURA 5

A) El circuito básico de los ganglios basales y sus neurotransmisores más característicos (Glu, glutamato; GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico), es modulado por interneuronas estriatales (colinérgicas; ACh, acetilcolina), y por otras eferencias como la del núcleo subtalámico (NST) y de la sustancia negra pars compacta (SNc). abreviaciones: SNr, sustancia negra pars reticulata; DA, dopamina; F, lóbulo frontal.

B) Esquema ampliado del circuito básico para el caudado-putamen (estriado dorsal y globo pálido dorsal), se enfatiza sobre algunos neuropéptidos que caracterizan diferentes vías estriadopálido y estriadonegales. El péptido Lys-Asn-neurotensina (LANT-6) se presenta en muchas neuronas GABAérgicas del pálido. Algunas interneuronas colinérgicas contienen la enzima carboxipeptidasa H (CHP) ó el péptido LANT-6. Algunos grupos celulares dopaminérgicos contienen también clecistoquinina (CCK) ó neurotensina (NT), ó una combinación de ambas. Otras abreviaciones: DYN, Dinorfina; ENK, encefalina; NPY, neuropéptido Y; n.v. tálamo, núcleo ventral del tálamo; SNI, sustancia negra pars lateralis; SOM, somatostatina; t.p.c., núcleo pedunculopontino. (Graybiel, 1990).



B

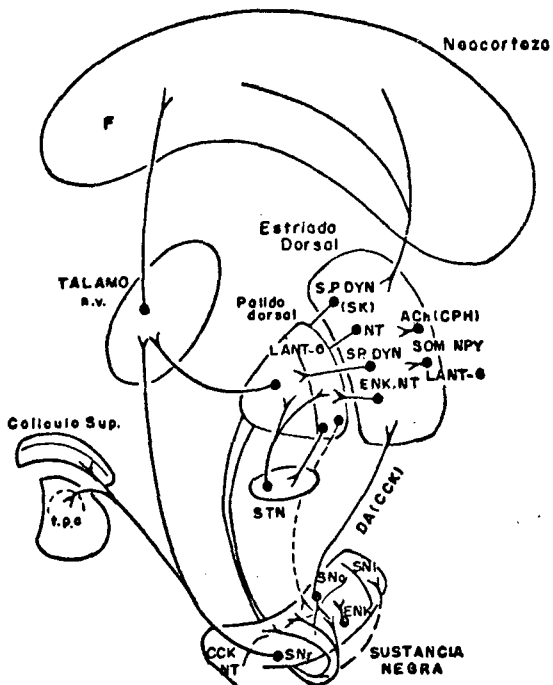


FIGURA 6

APARATO UTILIZADO PARA LA SUPERFUSION DEL TEJIDO

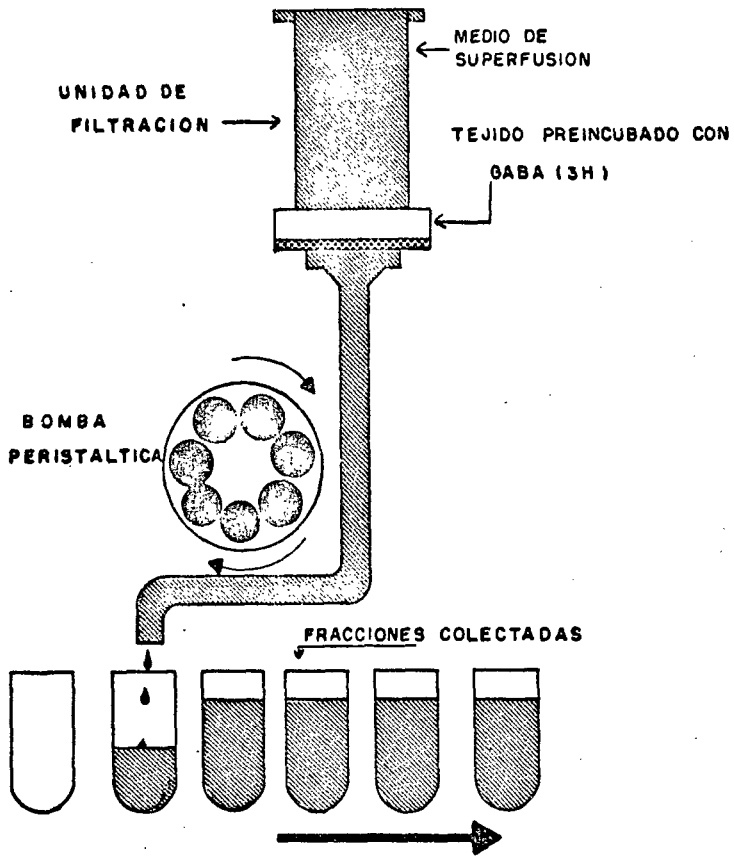


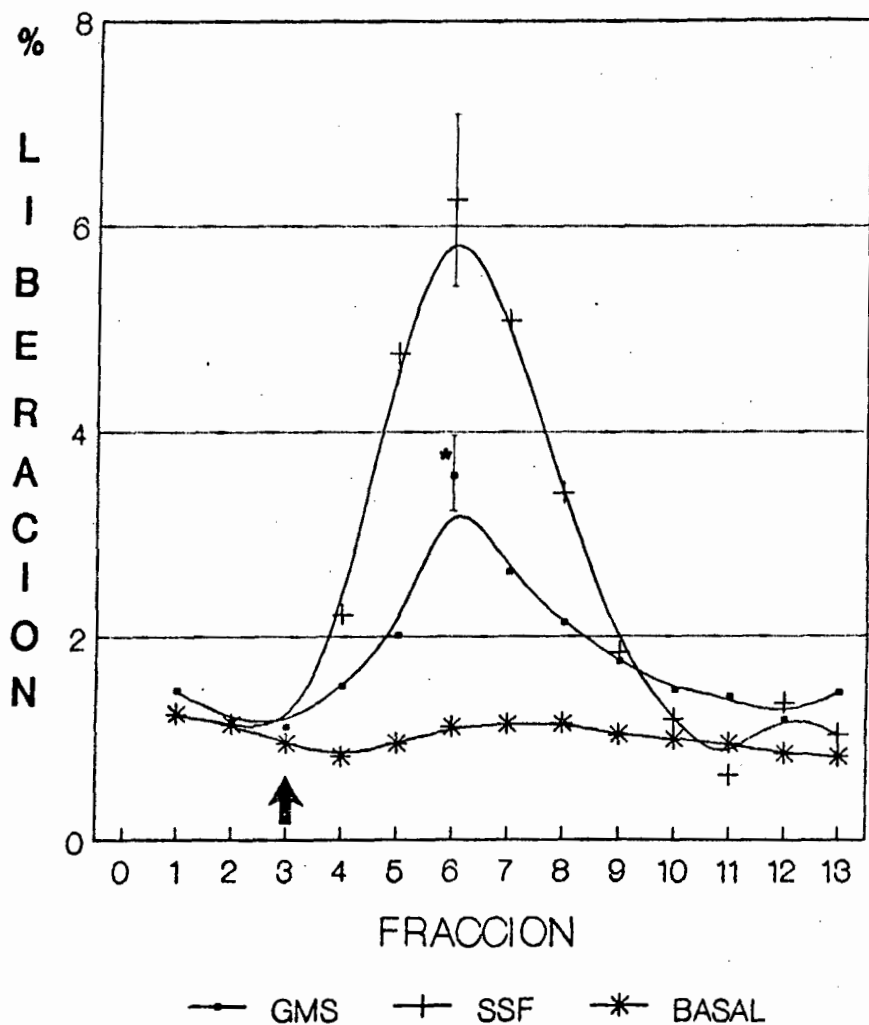
Fig 6

GRAFICA 1

EFFECTO DEL L-GLUTAMATO MONOSODICO EN LA LIBERACION DE  
[<sup>3</sup>H] GABA EN LA SUSTANCIA NEGRA

En esta grafica se presenta el efecto que ejerce el L-Glutamato monosódico administrado i.p. en la liberación estimulada por K<sup>+</sup> en presencia de Ca<sup>++</sup>. En la ordenada se presenta el porcentaje de radioactividad liberada con respecto al total incorporada y en la abcisa el numero de fracción colectada. La flecha indica el cambio de medio (53 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>) para inducir la liberación del [<sup>3</sup>H] GABA incorporado. Los valores de cada fracción representan la  $x \pm$  EEM de 5 experimentos por duplicado de las variables. abreviaciones: SSF: Solución Salina Fisiológica, GMS: L-Glutamato monosódico.

# LIBERACION DE [3H]-GABA EN SUSTANCIA NEGRA



•  $P < 0.05$

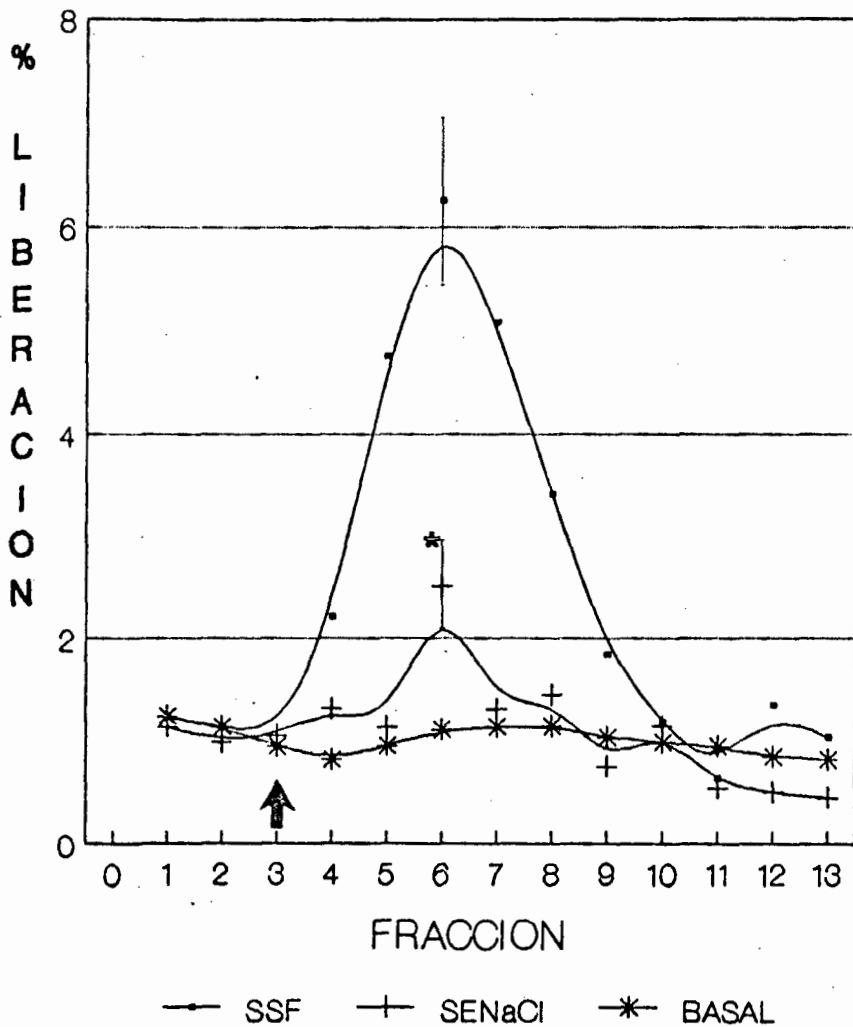
## GRAFICA 2

### EFFECTO DE LA SENaCl AL GMS EN LA LIBERACION DE [<sup>3</sup>H] GABA EN SUSTANCIA NEGRA

En esta grafica se representa el efecto que ejerce la administración i.p. de SENaCl al GMS en la liberación estimulada por K<sup>+</sup>. En la ordenada se presenta el porcentaje de radioactividad liberada con respecto al total incorporada y en la abcisa el numero de fracción colectada. La flecha indica el cambio de medio (53 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>) para inducir la liberación del [<sup>3</sup>H] GABA incorporado. Los valores de cada fracción representan la  $\bar{x} \pm$  EEM de 5 experimentos por duplicado de las variables. Abreviaciones: SENaCl: Solución de cloruro de sodio equimolar al GMS, GMS: L-Glutamato monosódico.



# LIBERACION DE [3H]-GABA EN SUSTANCIA NEGRA



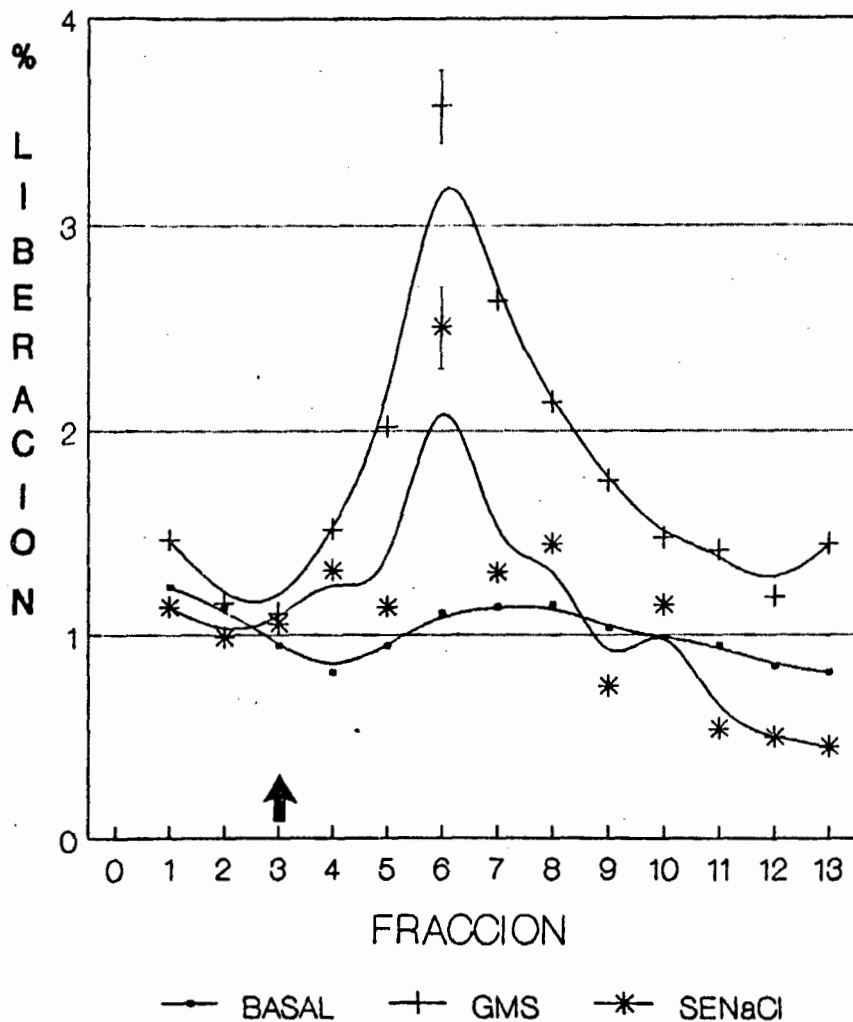
•  $P < 0.005$

### GRAFICA 3

#### LIBERACION DE [<sup>3</sup>H] GABA EN LA SUSTANCIA NEGRA

En esta grafica se compara la liberación estimulada por K<sup>+</sup> de [<sup>3</sup>H] GABA en la sustancia negra después de la administración i.p. de GMS y de SENaCl. En la ordenada se presenta el porcentaje de radioactividad liberada con respecto al total incorporada y en la abcisa el numero de fracción colectada. La flecha indica el cambio de medio (53 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>) para inducir la liberación del [<sup>3</sup>H] GABA incorporado. abreviaciones: GMS: L-Glutamato Monosódico, SENaCl: Solución de Cloruro De Sodio Equimolar al GMS.

# LIBERACION DE [3H]-GABA EN SUSTANCIA NEGRA



• P < 0.05

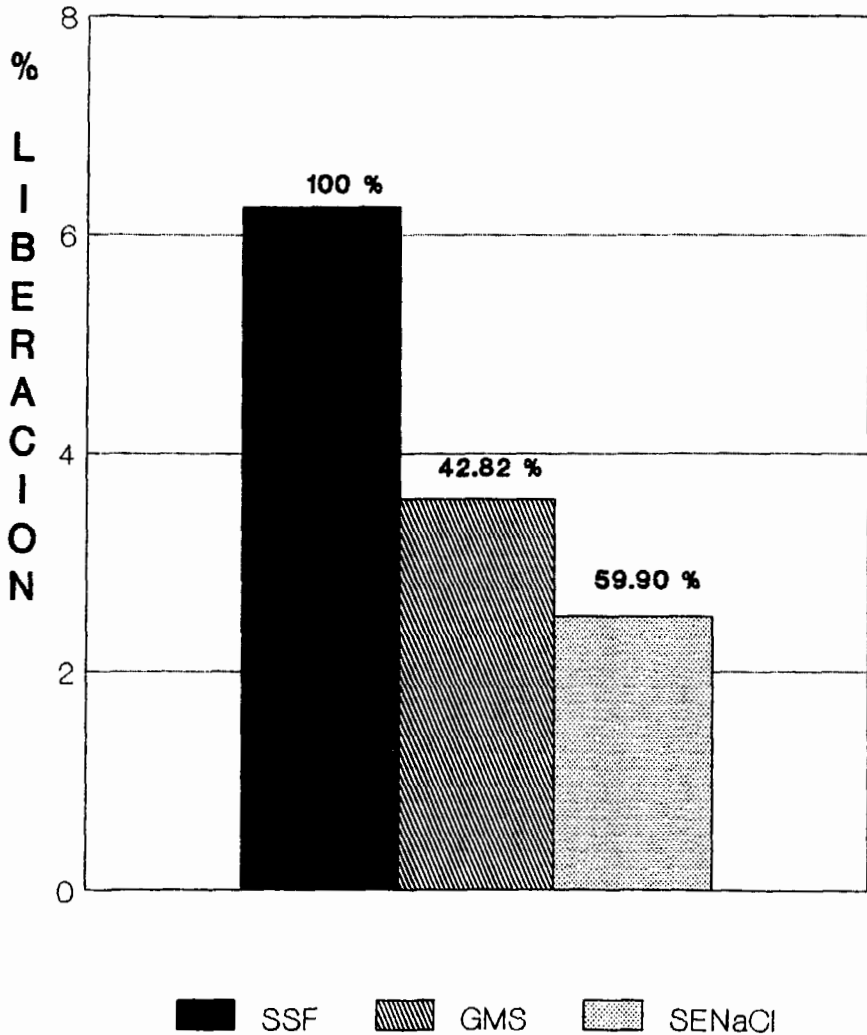
#### GRAFICA 4

### DISMINUCION EN LA LIBERACION DE [<sup>3</sup>H] GABA EN LA SUSTANCIA NEGRA

En esta grafica se representa el porcentaje de disminucion en la liberacion de [<sup>3</sup>H] GABA observado bajo los diferentes tratamientos aplicados. En la ordenada se presenta el porcentaje de radioactividad liberada con respecto al total incorporada y en la abcisa los tratamientos aplicados.

Partiendo del valor maximo de liberacion en el grupo testigo al cual se le aplico SSF se estimo el porcentaje de disminucion en los tratamientos aplicados. Abreviaciones: SSF: Solucion Salina Fisiologica, GMS: L-Glutamato Monosodico, SENaCl: Solucion de Cloruro de Sodio equimolar al GMS.

# DISMINUCION EN LA LIBERACION DE GABA-[3H]

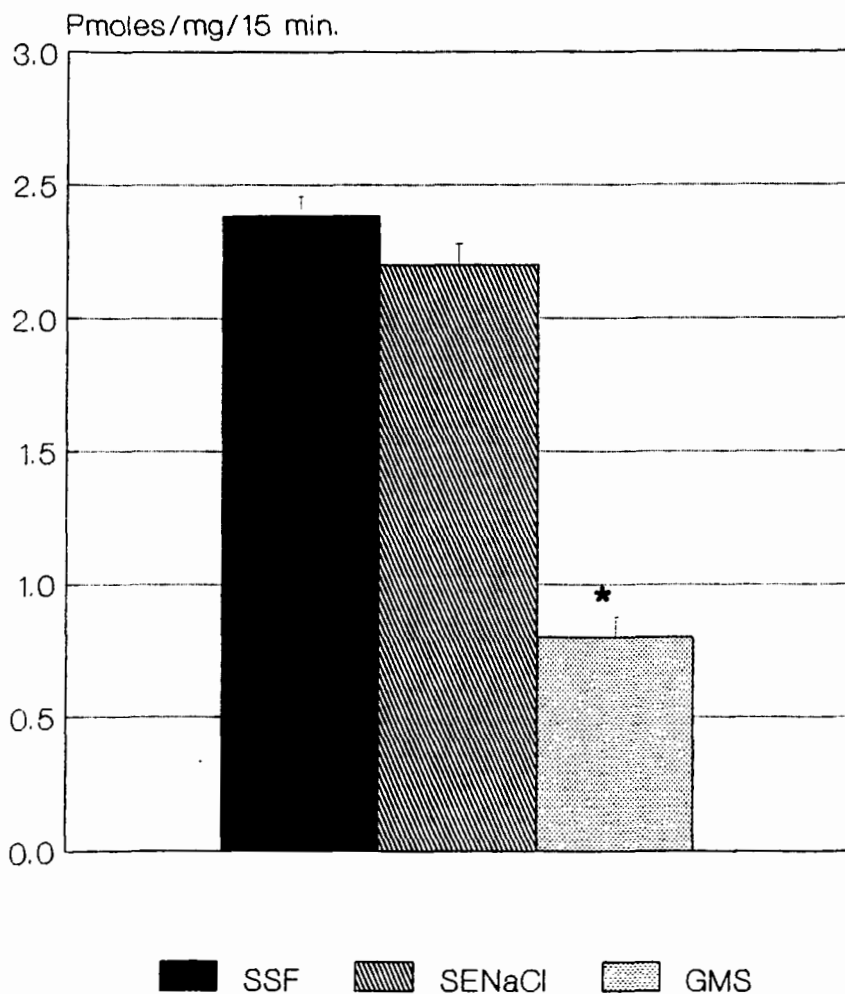


### GRAFICA 5

#### CAPTURA DE [<sup>3</sup>H] GABA EN LA SUSTANCIA NEGRA BAJO EFECTO DEL GMS "IN VIVO"

En esta grafica se representa el efecto que ejerce la aplicación i.p. de GMS a una dosis unica de 5 mg/g en la captura de [<sup>3</sup>H] GABA en la sustancia negra. En la ordenada se presenta los valores de captura en pMoles/mg/15 min. y en la abcisa el tratamiento aplicado. Los resultados expresan la  $\pm$  EEM de 6 experimentos de las variables. Abreviaciones: GMS: L-Glutamato Monosódico, SSF: Solución salina fisiológica, SENaCl: Solución de cloruro de sodio equimolar al GMS.

# CAPTURA DE [3H]-GABA EN SUSTANCIA NEGRA "IN VIVO"



\*  $P < 0.001$

### GRAFICA 6

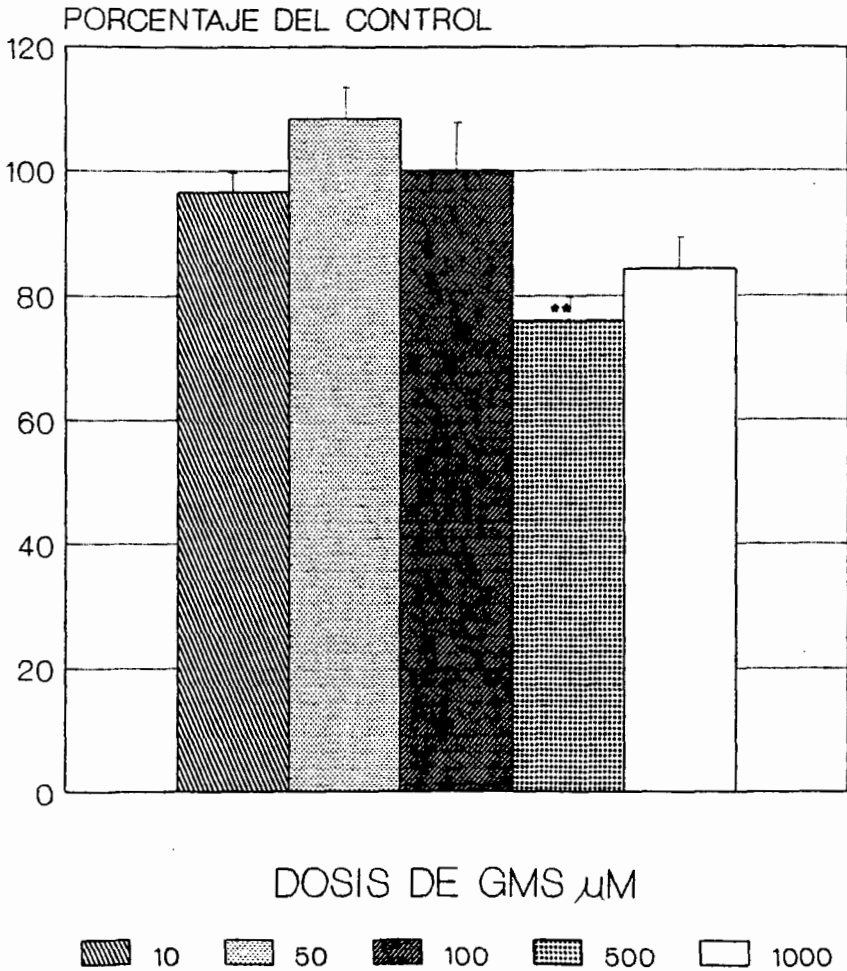
#### CAPTURA DE [<sup>3</sup>H] GABA EN LA SUSTANCIA NEGRA BAJO EFECTO DEL GMS "IN VITRO"

En esta grafica se representa el efecto en la captura de [<sup>3</sup>H] GABA que ejerce el GMS administrado "in vitro" en la sustancia negra a concentraciones de 10, 50, 100, 500 y 1000  $\mu$ M. En la ordenada se presenta el valor de captura en pMoles/mg/15 min. y en la abcisa la concentración de GMS utilizada. Los resultados expresan la  $x \pm$  EEM de 6 experimentos por variable. Abreviaciones: GMS: L-Glutamato Monosódico.

\*\* No presenta diferencia significativa con respecto al grupo control, ya que la desviación estandar del mismo es alta.



# CAPTURA DE [3H]-GABA "IN VITRO"



Guadalajara Jal. 15 de Julio de 1991

M. en C. CARLOS BEAS ZARATE  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
P R E S E N T E

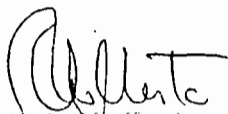
Estimado M. en C. Carlos Beas:

Por medio de la presente comunico a usted que el C. Javier García Velasco, pasante de la licenciatura en Biología con el número de registro - 082381015 ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado: LIBERACION DE (3H)-GABA EN LA SUSTANCIA NEGRA DE RATA BAJO EFECTO DEL L-GLUTAMATO MONOSODICO. Estudio bioquímico efectuado en el laboratorio de Neuroquímica - del área de investigación de esta Facultad.

Así mismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E



---

M. en C. Alberto Morales V.

Director de tesis



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Sección .....

Expediente .....

Número .....

C. JAVIER GARCIA VELASCO  
 P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "LIBERACION DE GABA<sub>3</sub> EN SUSTANCIA NEGRA DE RATA BAJO EFECTO DEL L-GLUTAMATO MONOSODICO" para obtener la Licenciatura en Biología.

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

A T E N T A M E N T E  
 " PIENSA Y TRABAJA "  
 Guadalajara, Jal., abril 8 de 1991.

EL DIRECTOR



M. EN C. *Beas Zarate* BEAS ZARATE

EL SECRETARIO

M. EN C. MARTIN P. TENA MEZA

c.c.p.- El M. en C. Alberto Morales Villagran. Director de Tesis. Pte.-  
 c.c.p.- El expediente del alumno.

CBZ/MPTM/cglr.

N contestar este oficio citese fecha y número