

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

83776

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó

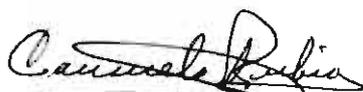
Alfonso Efraín Campos Sepúlveda
El día 16 de junio del año de 2003

Comité Tutorial:

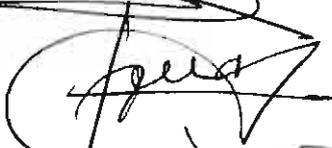
Tutor: Dr. Rubén Román Ramos



Asesor: Dra. Consuelo Rubio Poo



Asesor: Dr. Fructuoso Ayala Guerrero



Sinodal: Dra. Mariana Meckes Fischer



Sinodal: Dra. Alicia Lara Lemus



DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A la eterna memoria de mi madre †Esperanza Sepúlveda Olivos que con su amor, sensibilidad, inteligencia y humanismo supo guiarnos en la toma de las más importantes decisiones. Madre, desde el cielo y con Dios en donde estas, intercede por nosotros.

A mi padre, Benedicto Campos Chávez, el hombre que con su experiencia, disciplina y gran capacidad creadora me inculco la responsabilidad y un juicio crítico. Padre me siento profundamente orgulloso de ti.

A mi hermano Jaime, el otro único "remedio" que integra esta tenaz familia y que se ha caracterizado por su perseverancia en los proyectos que emprende.

Al gran ramillete de hermosas y nobles flores que enaltecen a mi familia, mis hermanas: Lucila, Guadalupe, Lourdes, Goretti, Beny y Angelica que con sus numerosas virtudes me han otorgado su apoyo en todo momento.

Especial reconocimiento y gratitud a mi nueva familia, mi bella, tierna y comprensiva esposa Maria Asunción Quintana Andrade y a mi trébol de hijas: Lizeth, Itzia y Sesangare quienes en conjunto han recorrido conmigo este arduo camino con sacrificios, desvelos y satisfacciones para forjarnos un futuro de cultura, dignidad y libertad.

Con una distinción especial para los Drs. Rubén Román Ramos, Consuelo Rubio Poo, Fructuoso Ayala Guerrero, Mariana Meckes Fischer, Alicia Lara Lemus y Francisco Alarcón Aguilar, maestros talentosos y jueces críticos que confiaron en mí y sabiamente supieron conducirme para llevar a cabo este proyecto.

A las numerosas generaciones de alumnos y ex-alumnos que han constituido la motivación para continuar mi superación académico-científica y humanística.

Al Laboratorio de Toxicología del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM, lugar donde se realizo el presente trabajo así como al Departamento de Ciencias de la Salud de la División de CBS, de la UAM-I, ambas instituciones que me han otorgado las facilidades para realizar mi actividad que son mi pasión: la docencia, la investigación y la difusión de la cultura.

RESUMEN

La administración neonatal de glutamato monosódico (GMS) en el ratón, causa neurotoxicidad en el Sistema Nervioso Central (SNC) que resulta en alteraciones neuroquímicas, endocrinas, metabólicas y conductuales. Dentro de los sistemas neuroquímicos afectados se encuentra la neurotransmisión GABAérgica. En este trabajo se estudió el efecto del tratamiento neonatal en el ratón y la rata con el GMS (2 mg/g sc el 2º y 4º día posnatal, seguida de 4 mg/g el 6º, 8º y 10º día posnatal) sobre la susceptibilidad al efecto hipotérmico, hipnótico y letal del etanol (2-3.5 g/kg, ip), del tiopental (75-300 mg/kg, ip) del fenobarbital (50-200 mg/kg, ip), del diazepam (12.5-50 mg/kg, ip) y del GABA (50-500 µg/5µl, ic), cinco a seis meses después del tratamiento con el GMS. El grupo control fue tratado solamente con el vehículo (solución salina). También se estudió la susceptibilidad de los animales neurointoxicados y en los controles a la administración crónica de los agonistas GABAérgicos, durante 30 días. A otro grupo de ratones neurointoxicados con el GMS y en los controles se les administro 2.5 g/kg, po de etanol y se determinaron las curvas de evolución temporal de las concentraciones sanguíneas del alcohol por cromatografía de gases y se calcularon los parámetros farmacocinéticos. También se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) las concentraciones cerebrales del GABA, tanto en animales neurointoxicados como en los controles. A un grupo de ratas adultas neurointoxicadas neonatalmente con el GMS y en un grupo control se realizó diariamente durante 30 días un frotis vaginal para determinar el perfil del ciclo estral. El tratamiento no neonatal con el GMS incrementa significativamente la susceptibilidad al efecto hipotérmico, hipnótico y

letal del etanol, del diazepam y del GABA bajo condiciones de administración aguda y crónica (administración diaria durante 30 días) y disminuye significativamente la susceptibilidad a los mismos efectos del tiopental y del fenobarbital administrados aguda y crónicamente (durante 30 días), comparados con la susceptibilidad del grupo control. Hubo una disminución significativa del peso corporal de los animales pretratados con el GMS que osciló entre el 30 y el 50% del peso corporal inicial, bajo la administración crónica de los fármacos, independientemente del agonista GABAérgico. Las curvas de evolución temporal de las concentraciones sanguíneas del etanol no mostraron diferencias significativas. Las concentraciones cerebrales de GABA fueron significativamente menores en los animales neurointoxicados. El perfil citológico vaginal de las ratas neurointoxicadas difiere significativamente del perfil citológico vaginal del grupo control. Concluimos que la administración de GMS a roedores en el periodo neonatal, produce alteraciones permanentes en el SNC que dan lugar a cambios en la susceptibilidad a los agonistas GABAérgicos en la edad adulta y que dichas modificaciones dependen de cambios en los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos inducidos por el GMS. Es importante alertar el riesgo potencial que representa el consumo del GMS en los alimentos, sustancia que de ser un neurotransmisor excitatorio, en altas dosis se convierte en excitotóxico.

SUMMARY

Neonatal administration of monosodium glutamate (MSG) to mice induces neurotoxicity of the central nervous system (CNS) resulting in neurochemical, endocrine, metabolic and behavioral abnormalities. In the neurochemical systems affected is the GABAergic neurotransmission. In this work we studied the effect of neonatal treatment to mice and rats with MSG (2 mg/g sc on the 2nd and 4th days after birth followed by 4 mg/g on days 6th, 8th and 10th) on the ethanol (2-3.5 g/kg, ip), thiopental (75-300 mg/kg, ip), phenobarbital (50-200 mg/kg, ip), diazepam (12.5-50 mg/kg, ip) and GABA (50-400 µg/5 µl, ic) induced hypothermia, hypnosis and lethality five to six months later MSG treatment. The control group was vehicle-treated only (saline injection). It was also studied the susceptibility of neurointoxicated animals and controls under chronic administration conditions, during 30 days, of the GABAergic agonists. To other groups of neurointoxicated mouse with the MSG and the control animals were administered 2.5 g/kg, po of the ethanol and the curves of temporary evolution of the blood concentrations of the alcohol were determined by chromatography of gases and the pharmacokinetics parameters were calculated. They were also measured by HPLC, the brain concentration of the GABA in neurointoxicated and control animals. In a group of mature neurointoxicated rats and in control group they were carried out daily during 30 days vaginal smear to determine the stadium of the oestrous cycle. The MSG treatment significantly increase the susceptibility to the hypothermic, hypnotic and lethal effect of ethanol and diazepam acutely and chronically (daily administration for 30 days) and significantly decreased the susceptibility to the same effects of thiopental and

phenobarbital acutely and chronically administered (daily administration for 30 days), when compared either to the control group. Was significantly loss of the corporal weight of the MSG pretreatment animals which oscillate between 30 and 50% of the corporal initial weight, under the chronic administration of the drugs, independently of the GABAergic agonist. The temporal evolution curves of the ethanol blood concentrations in the MSG and control, didn't show significant differences. The concentrations of GABA were significantly smaller in the brains of the neurointoxicated animals. The profile vaginal citologic of the neurointoxicated rat with MSG was significantly different to the profile that showed the rats of the control group. We conclude that the neonatal administration of MSG to rodent, induced permanent alterations in the CNS that give place to changes in the susceptibility to the GABAergic agonists in the mature age and that such modifications depend on changes in the pharmacodynamic and pharmacokinetics processes induced by the MSG administration. Also, it is important to alert the potential risk for the human that involves the consumption of the MSG in the foods that of being an excitatory neurotransmitter, in high dose, becomes in excitotoxic.

INDICE	pag
I. INTRODUCCION	2
II. ANTECEDENTES	4
1. El ácido glutámico como neurotransmisor excitatorio	4
A. Aspectos neurofisiológicos	5
B. Aspectos neuroquímicos	9
C. Aspectos neuropatológicos	11
2. Mecanismos de la neurotoxicidad por el glutamato monosódico (GMS)	16
3. Fármacos depresores del SNC y neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica	20
III. JUSTIFICACION	23
IV. HIPOTESIS	24
V. OBJETIVO GENERAL	24
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	24
VII. MATERIAL Y METODOS	25
1. Animales	25
2. Procedimiento para inducir la neurotoxicidad con el GMS	26
3. Estudios de susceptibilidad a los agonistas GABAérgicos	27
A. Susceptibilidad bajo la administración aguda y crónica de etanol	27
B. Susceptibilidad bajo la administración aguda y crónica de tiopental	28
C. Susceptibilidad bajo la administración aguda y crónica de fenobarbital	29
D. Susceptibilidad bajo la administración aguda y crónica de diazepam	30
E. Susceptibilidad bajo la administración aguda del GABA	31
4. Determinación de las concentraciones cerebrales de GABA	31
5. Determinación de las concentraciones sanguíneas de etanol	32
6. Análisis estadístico de los resultados	33
VIII. RESULTADOS	35
IX. DISCUSION	80
X. CONCLUSIONES	87
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	88

I. INTRODUCCION

El glutamato monosódico (GMS) es la sal monosódica del ácido glutámico (GLU), principal y más abundante neurotransmisor excitatorio en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos. El ácido glutámico (GLU) es un aminoácido dicarboxílico no esencial que forma parte de la mayoría de las proteínas, es precursor de varias moléculas de interés biológico como el glutatión y el ácido fólico y también participa en el metabolismo intermediario (Fagg y Foster, 1983; Erecinska y Silver, 1990; Stone, 1995). Otro aspecto particularmente importante es que el GLU es el precursor del ácido γ -amino butírico (GABA), que en contraste con el GLU, es el principal y más abundante neurotransmisor inhibitorio en el SNC de los mamíferos (Fagg y Foster, 1983; Erecinska y Silver, 1990; Greenamyre, 1986; Danysz y cols., 1995). El GMS es un polvo blanco inodoro, con intenso sabor a carne y se presenta como prismas cristalinos rómbicos que son muy solubles en agua e insolubles en etanol. Su fórmula semidesarrollada es $\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2)\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COONa}$, tiene un peso molecular de 169.1 y su contenido elemental es de C 32.09%, H 5.39%, N 7.49%, O 42.75% y Na 12.28% (Kinoshita, 1961).

El GMS se presenta en la naturaleza como la forma levógira del GLU y se puede obtener sintéticamente por la acción del *Micrococcus glutamicus* sobre carbohidratos provenientes de vegetales.

Por otra parte, existe información del uso milenario que tiene en la cultura China un saborizante para diferentes tipos de alimento que se extrae de la alga marina *Laminariae japonicum* y fue hasta 1910 que Ikeda demostró que el agente responsable de incrementar el sabor de los alimentos es el GLU. A partir de este

hecho se escaló e industrializó la producción del GMS y se incrementó notablemente su uso como aditivo alimentario para diversos productos naturales y artificiales destinados al consumo humano (Cagan y cols., 1979; Filer, 1979).

Por otro lado, a finales de la década de los 60's se demostró que la administración de aminoácidos dicarboxílicos como el GLU y otros agentes estructuralmente relacionados, en dosis altas, inducen neurotoxicidad en roedores neonatos, estos hallazgos fueron ampliamente confirmados y extendidos para otras especies. Al respecto se sabe que la neurotoxicidad provocada por la administración de GMS da lugar a alteraciones neuroquímicas, neuroendocrinas, metabólicas y conductuales (Lucas y Newhouse, 1957; Olney, 1969; Olney, 1972; Olney y cols., 1977; Olney y cols., 1977; Heywood y Worden, 1979; Kizer y cols., 1978; Meister y cols., 1989; Meister, 1991; Chambille y Serviere, 1993; Mathis y Ungerer, 1992; McDonald y cols., 1993; Olney y cols., 1974; Schatzki y cols., 1990; Winn y cols., 1991; Young y cols., 1991; Zaczek y cols., 1981; Zaczek y Coyle, 1982).

A pesar de la abundante información que existe sobre la neurotoxicidad inducida por el aminoácido excitatorio, son escasos los datos sobre las modificaciones en la susceptibilidad que muestran los roedores neurointoxicados con el GMS a agonistas y antagonistas cuyo blanco farmacológico son los sistemas neuroquímicos afectados por el aminoácido excitatorio. Por lo anterior, el presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de las modificaciones en la susceptibilidad a los efectos de algunos agonistas GABAérgicos (utilizados en la especie humana) en que muestran los animales neurointoxicados neonatalmente con GMS (Kinoshita, 1961; Cagan y cols., 1979; Filer, 1979).

II. ANTECEDENTES

1. El GLU como neurotransmisor excitatorio

El SNC contiene altas concentraciones de algunos aminoácidos, en particular el GLU, el aspartato (ASP) y el GABA, ampliamente distribuidos en el encéfalo y cuya capacidad para alterar la función neuronal es muy potente y específica (Erecinska y Silver, 1990; Fagg y Foster, 1983; Greenamyre, 1986; Stone, 1995; Danysz y cols., 1995). En términos generales los aminoácidos dicarboxílicos como el GLU y el ASP despolarizan la membrana neuronal e inducen potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE), en tanto que los aminoácidos monocarboxílicos como el GABA, la glicina y la taurina se comportan como neurotransmisores inhibitorios, es decir hiperpolarizan la membrana neuronal e inducen potenciales postsinápticos inhibitorios (PPSI), (Stone, 1995; Erecinska y Silver, 1990; Fagg y Foster, 1983; Filer, 1979).

Actualmente, es un hecho plenamente establecido que el GLU es el principal y más abundante neurotransmisor excitatorio en el SNC de los mamíferos y se sabe que más del 70% de las sinapsis excitatorias utilizan como neurotransmisor al GLU. Los antecedentes que sustentan su función como neurotransmisor datan de hace ya casi medio siglo, cuando se informó que la administración del glutamato induce importantes efectos en el SNC (Hayashi, 1954). Posteriormente, se demostró que el GLU se libera de tejido cerebral durante la transmisión sináptica evocada y que existe un mecanismo de alta afinidad de captura del GLU por la membrana presináptica selectivamente localizada en ciertas poblaciones neuronales (vías nerviosas glutamatérgicas). En la presinapsis dicho GLU es almacenado en vesículas sinápticas para ser liberado cuando tales fibras

nerviosas son estimuladas; se ha demostrado que la liberación presináptica del GLU, al igual que para otros neurotransmisores, es un proceso dependiente del calcio (Erecinska y Silver, 1990; Fagg y Foster, 1983; Greenamyre, 1986; Stone, 1995; Danysz y cols., 1995). Más recientemente, con el desarrollo de antagonistas selectivos de los efectos de los aminoácidos excitatorios, se han identificado los sitios de unión del GLU en el SNC. Adicionalmente, con el empleo de métodos electrofisiológicos, neuroquímicos, inmunocitoquímicos y farmacológicos ha sido posible el mapeo de las vías glutamatérgicas (Tabla I) y, en cierta medida, la identificación, distribución y caracterización de los diferentes tipos y subtipos de receptores, así como los mecanismos de transducción de señales a los que se encuentran acoplados los receptores del GLU en el SNC (Tabla II y III). Con base en lo anterior, se considera que el GLU reúne las características para ser considerado genuinamente como neurotransmisor (Erecinska y Silver, 1990; Fagg y Foster, 1983; Greenamyre, 1986; Stone, 1995; Danysz y cols., 1995).

A. Aspectos neurofisiológicos.

Como ya se mencionó, el GLU es el principal y más abundante neurotransmisor excitatorio en el SNC de los mamíferos y participa normalmente en la mayoría de las sinapsis excitatorias para la neurotransmisión rápida, en diversas áreas del SNC (Curtis y Watkins, 1960; Collingridge y Lester, 1989; Nicoletti y cols., 1996).

La neurotransmisión glutamatérgica se encuentra involucrada de manera sobresaliente en la plasticidad neuronal como la Potenciación a Largo Plazo (LTP), fenómeno que resulta de la estimulación de alta frecuencia y que da lugar a una mayor eficiencia sináptica, dicho evento está muy relacionado con el proceso del

TABLA I. Principales vías glutamatérgicas mejor caracterizadas desde el punto de vista neuroanatómico, neurofisiológico, neuroquímico y farmacológico (adaptado de Stone, 1995).

ORIGEN	BLANCO
Neocorteza	Neocorteza de asociación y comisural caudado-putamen; sustancia nigra; núcleo pontino; médula espinal
Corteza entorrinal	Fascia dentata
Fascia dentata	CA4 de hipocampo CA3 de hipocampo
Hipocampo (CA3)	CA1 de hipocampo incluyendo colateral de Schaffer Núcleos laterales del dectum
Cerebelo (cél. granulares)	Corteza de cerebelo, estrato molecular
Núcleo pontino	Fibras musgosas de cerebelo
Oliva inferior	Fibras trepadoras de cerebelo
Fotorreceptores de retina	Células bipolares de la retina
Células bipolares de la retina	Células amácrinas y ganglionares de la retina
Células ganglionares de la retina	Colículo superior
Fibras nerviosas cocleares	Núcleo coclear
Fibras aferentes primarias espinales	Médula espinal, núcleo gracilis y cuneado

aprendizaje y la consolidación de la memoria (Maren y cols., 1993; Bliss y Collingridge, 1993; Riedel y Reyman, 1993; Smirnova y cols., 1993; Staubli y cols., 1994; McGaugh e Izquierdo, 2000; Park y cols., 2000). Este proceso de plasticidad neuronal que fue descrito inicialmente a nivel de hipocampo, se ha extendido a otras regiones del SNC (Brown y cols., 1988; Collingridge y Singer, 1990; Bortolotto y Collingridge, 1993; Arai y Lynch, 1992; Bashir y cols., 1993). Es importante señalar que el GLU también está relacionado con el tipo opuesto de plasticidad neuronal: la Depresión a Largo Plazo (LTD). La información disponible indica que lo que determina la presentación de la LTP o la LTD, depende del tipo de receptor, de su localización, de la frecuencia y patrón de estimulación del receptor sináptico: la neurotransmisión glutamatérgica también está involucrada en los procesos de la visión (Nakajima y cols., 1993; Kim y cols., 2000), de la audición, de la nocicepción aguda y en el dolor crónico relacionado con procesos inflamatorios (Chizh y cols., 2001; Obrenovitch, 2001; Dray y cols., 1994; Yaksh, 2002). También hay evidencia de su participación en el desarrollo de la dependencia o en la expresión del síndrome de abstinencia a algunos psicofármacos como los opioides (Zhu y Barr, 2001; Howard y cols., 2001), así como en los efectos agudos y crónicos del etanol, incluyendo el síndrome de carencia (Cummins y cols., 1990; Tsai y cols., 1995; Nie y cols., 1993; Hoffman y cols., 1989; Peoples y Tabakoff, 1994; Rassnick y cols., 1992). Este aminoácido excitatorio es el precursor del ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio en mamíferos y se acepta que, en gran medida, la homeostasis de la excitabilidad neuronal depende del equilibrio entre la neurotransmisión glutamatérgica y la neurotransmisión GABAérgica (Filer, 1979; Fagg y Foster, 1983; Erecinska y Silver, 1990).

Las diversas vías que utilizan al GLU como neurotransmisor en el SNC se han caracterizado mediante técnicas electrofisiológicas, inmunocitoquímicas y farmacológicas. A continuación se resumen las vías glutamatérgicas mejor caracterizadas (Stone, 1995; Fagg y Foster, 1983; Erecinska y Silver, 1990; Vincent y cols., 1991):

1. Vías que emergen de la corteza frontal hasta regiones cerebrales ricas en dopamina como el cuerpo estriado, el tubérculo olfatorio, el núcleo acumbens y la sustancia nigra.
2. Vías que van de la corteza sensorial y motora al núcleo rojo, núcleo pontino, núcleo cuneado y a la médula espinal; vías que van de la corteza entorrinal, piriforme y medio frontal a la amígdala.
3. Vías de la corteza piriforme al tálamo, de corteza visual al núcleo geniculado lateral y al colículo superior.
4. Vías que van desde la corteza entorrinal al giro dentado del hipocampo.
5. Proyecciones de las células piramidales de hipocampo al septo lateral y desde el hipocampo y subículo al núcleo acumbens, hipotálamo mediobasal y a los cuerpos mamilares.
6. En el cerebelo, se sabe que el GLU es liberado por las células granulares y el aspartato desde las células trepadoras. A nivel de hipocampo se sabe que el GLU es el neurotransmisor de las fibras colaterales de Schaffer y las fibras comisurales.
7. La neurotransmisión glutamatérgica se ha caracterizado en varias vías sensoriales como en los nervios auditivos que terminan en el núcleo coclear, en las fibras de la corteza olfatoria lateral, en la retina y en las fibras aferentes primarias que terminan en la médula espinal.

B. Aspectos neuroquímicos

Se sabe que tanto los efectos inducidos por la neurotransmisión normal como bajo condiciones de excitotoxicidad, son mediados por receptores específicos para el GLU. Así se han identificado receptores para agonistas del GLU como el N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido kaínico (KA), el ácido alfa-amino-2,3-dihidro-5-metil-3-oxo-4-isoxazol propiónico (AMPA) y el L-AP4, lo que ha permitido clasificar a estos sitios de unión en receptores ionotrópicos (NMDA y no NMDA) y, en receptores metabotrópicos los que se encuentran acoplados a proteínas G como mecanismo de transducción de señales (Collingridge y Singer, 1990; Olney, 1989; Mody y McDonald, 1995; Greenamyre, 1986; Danysz y cols., 1995; Schoepp y Conn, 1993; Koroshetz y Moskowitz, 1996; Wisden y Seeburg, 1993; Dingledine y cols., 1999; Alexander y cols., 2001).

A la fecha se han identificado y caracterizado desde el punto de vista farmacológico, electrofisiológico y molecular, dos tipos de receptores acoplados a canales iónicos dependientes de ligando (receptores ionotrópicos), los de tipo NMDA, cuyo agonista prototipo es el N-metil-D-aspartato y los de tipo NoNMDA, entre los que figuran los receptores para AMPA y kainato (Tabla II). Este tipo de receptores tienen en común, desde el punto de vista molecular, el poseer varias subunidades transmembranales y estar acoplados a canales iónicos que incrementan la conductancia a cationes como el K^+ , el Na^+ y el Ca^{++} . En el caso del receptor de tipo NMDA, su actividad es modulada por las poliaminas (espermina y espermidina) y la glicina que actúa como coagonista y se fija a un sitio específico. El receptor-canal NMDA es bloqueado por el Mg^{++} y por otros antagonistas no competitivos como la ketamina, la fenciclidina, el dextrometorfán, la memantina y por el MK-801 cuyo nombre genérico es dizolcipina

(Bachurin y cols., 2001).

Como se puede apreciar en la Tabla III. a la fecha se han caracterizado ocho subtipos de receptores metabotrópicos (mGluR₁ al mGluR₈), cuya característica molecular común es la de poseer siete dominios transmembranales y emplear como mecanismo de transducción de señales a la superfamilia de proteínas reguladoras de nucleótidos de guanina (Proteínas G). Algunos receptores metabotrópicos se encuentran acoplados de manera inhibitoria a través de Gi/o al efector adenil ciclasa (mGluR₂, mGluR₃, mGluR₄, mGluR₆, mGluR₇ y el mGluR₈), lo que da lugar a una reducción en la síntesis del 3',5'-adenosinmonofosfato cíclico (AMPc); en tanto que otros receptores metabotrópicos (mGluR₁ y mGluR₅) a través de Gq/11 se encuentran acoplados a la Fosfolipasa C, cuya activación induce un incremento en las concentraciones intracelulares de segundos mensajeros como el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) y el Diacilglicerol (Barnes y Henley, 1992; Collingridge y Lester, 1989; Okamoto y cols., 1994; Prezeau y cols., 1994; Tanabe y cols., 1993; Winder y cols., 1993; Dingledine y cols., 1999; De Blasi y cols., 2001; Dev y cols., 2001; Alexander y cols., 2001).

En algunos casos, como en las células de la retina, se ha descrito que la activación del mGluR₆, incrementa las concentraciones del AMPc (Winder y cols., 1993).

Es importante señalar que recientemente se han descrito diversos subtipos e isoformas adicionales de receptores glutamatericos con propiedades fisiológicas y farmacológicas diferentes, los que incluso han sido clonados; así mismo se han desarrollado numerosos agonistas y antagonistas selectivos para los diferentes tipos y subtipos de receptores (Tabla II, III y IV), algunos de ellos con alto potencial terapéutico y que se encuentran en diferentes fases de investigación preclínica y

clínica (Watkins y cols., 1990; Willetts y cols., 1990; Iversen, 1994; Golzan y Ben-Ari, 1995; Koroshets y Moskowitz, 1996; Nicoletti y cols., 1996; Piomelli y cols., 2000; Stone y cols., 1981; Danysz y cols., 1995; Masu y cols., 2001; Bachurin y cols., 2001; Chizh y cols., 2001).

Un aspecto que ha llamado recientemente la atención es que la existencia de receptores al GLU no se restringe al SNC, ya que se ha demostrado la presencia de tales receptores a nivel periférico en numerosos órganos como: el corazón, los pulmones, el hígado, los riñones, los testículos, el timo, las glándulas adrenales y, sobre todo, en tejido no neural como los queratinocitos, los melanocitos, los osteoblastos y osteoclastos, los megacariocitos y las plaquetas (Dingledine y Conn, 2000; Gill y cols., 2000; Sinsky y Donnerer, 1998; Skerry y Genever, 2001; Morhenn y cols., 1994; Moroni y cols., 1986) .

C. Aspectos neuropatológicos.

A pesar de su función normal como neurotransmisor excitatorio, se sabe que la administración exógena del GLU o del GMS y otros agonistas, inducen neurotoxicidad en varias especies animales (Lucas y Newhouse, 1957; Olney, 1969; Olney, 1972; Olney y cols., 1977; Olney y cols., 1979; Olney y cols., 1980; Heywood y Worden, 1979; Kizer y cols., 1978; Ben-Ari, 1980; Meister y cols., 1989; Meister, 1991; Chambille y Serviere, 1993; Mathis y Ungerer, 1992; McDonald y cols., 1993; Olney y cols., 1974; Schatzki y cols., 1990; Winn y cols., 1991; Young y cols., 1991; Zaczek y cols., 1981; Zaczek y Coyle, 1982; Friedman y cols., 1994).

También, la alteración en la neurotransmisión glutamatérgica se ha relacionado con

TABLA II. Clasificación de los receptores ionotrópicos al glutamato. Se indican los agonistas y antagonistas selectivos, los bloqueadores de los canales y los radioligandos que han servido para la caracterización de los receptores. También se indican los efectores y se da información sobre la estructura molecular (Alexander y cols., 2001)

Nomenclatura	N M D A		A M P A	Kainato
	Glutamato	Glicina		
Agonista selectivo	NMDA L-aspartato D,L(tetrazol-5-il)glicina	Glicina D-serina	AMPA (S)-5-fluorowillardina	Kainato, ácido domoico, ATPA LY339434 (S)-5-iodowillardin (2S,4R)-4-metil glutamato
Antagonista selectivo	D-AP5 CGS19755 CGP37849 LY233053	5,7-iclorokinurenato MNQX L689560	NBQX LY293558 GYK153655 (no Competitivo) ATPO	LY294486
Bloqueador del canal	Mg ⁺⁺ Dizocilpina(MK801) Ketamina Fenciclidina	—	Poliaminas intracelulares. Argiotoxina y Jorotoxina.	Poliaminas intracelulares
Radioligando	[³ H]CPP, [³ H]CGS19755 [³ H]CGP39653 [³ H]dizocilpina	[³ H]Glicina [³ H]L689560 [³ H]MDL10551	[³ H]AMPA [³ H]CNQX	[³ H]Kainato [³ H](2S,4R)-4-metil glutamato
Efector	Int. Na ⁺ / K ⁺ / Mg ⁺⁺		Int. Na ⁺ / K ⁺ / Ca ⁺⁺	Int. Na ⁺ / K ⁺ / Ca ⁺⁺
Información estructural	Ensamblaje de subunidades hetero-oligoméricas. Los sitios de unión para el Glutamato y para la Glicina se encuentran en las subunidades NR2 y NR1, respectivamente.		Ensamblaje de cuatro (GluR1-4) subunidades homo o hetero-oligoméricas.	Ensamblaje de varias subunidades homo o hetero-oligoméricas (GluR5-7, KA1 o KA2)

TABLA III. Clasificación de los receptores metabotrópicos al glutamato. Se indica la nomenclatura de los receptores y de sus antagonistas selectivos. Se muestran los mecanismos de transducción a los que están acoplados. Incluye información sobre la estructura molecular de 7DTM (siete dominios transmembranales), aminoácidos para los receptores del humano (h) el ratón (m) y de la rata (r).

Nomenclatura	mglu ₁	mglu ₂	mglu ₃	mglu ₄	mglu ₅	mglu ₆	mglu ₇
Otros nombres	mGluR ₁	mGluR ₂	mGluR ₃	mGluR ₄	mGluR ₅	mGluR ₆	mGluR ₇
Agonista selectivo	DHPG 3HPG	LY389795 LY379268 LY354740 DCG-IV 2R4R-APDC	LY389795 LY379268 LY354740 DCG-IV NAAG 2R,4R-APDC	L-AP4 LSOP (RS)PPG	CHPG DHPG 3HPG (S)-(+)-CBPG	homo-AMPA 1-benzilAPDC (RS)PPG	LSOP L-AP4 (RS)PPG
Antagonista selectivo		LY341495 PCCG-4 EGLU LY307452	LY341495 EGLU LY307452	MAP4	SIB1757 SIB1893 MPEP 4CPG LY393675	MAP4 THPG	
Transducción	Gq/11	Gi/o	Gi/o	Gi/o	Gq/11	Gi/o	
Estructura 7DTM	h1194 m1199 r1199	h872 r872	h877 m879 r879	h912 r912	h1212 r1203	h877 m871	

TABLA IV. Fármacos que afectan el sistema glutamatérgico desarrollados o en fase de desarrollo (adaptada de Danyysz y cols., 1995).

FARMACO	ACCION	APLICACION	FASE
Amantadina	Bloqueador NMDA	Antiparkinsoniano	Mercado
Budipina	Bloqueador NMDA	Antiparkinsoniano	Clínica III
Carvedilol	Bloqueador NMDA	Neuroprotector	Mercado
Felbamato	Bloqueador NMDA	Antiepiléptico	Mercado
Flupirtina	Bloqueador NMDA	Analgésico, antiepiléptico	Mercado
Memantina	Bloqueador NMDA	Demencia y espasticidad	Mercado
Cerestat	Bloqueador NMDA	Trauma, ataque apopléjico (AA)	Clínica II
Remacemida	Bloqueador NMDA	Antiepiléptico, Huntington, AA	Clínica II
ADCI	Bloqueador NMDA	Antiepiléptico	Preclínica
Araxin	Bloqueador NMDA	Neuroprotector	Preclínica
BI-II-277CL	Bloqueador NMDA	Ataque apopléjico (AA)	Preclínica
ES-242s	Bloqueador NMDA	Neuroprotector	Preclínica
FR-115427	Bloqueador NMDA	Neuroprotector	Preclínica
WIN-83480-2	Bloqueador NMDA	Ataque apopléjico (AA)	Preclínica
Selfotel	Competitivo NMDA	Ataque apopléjico (AA)	Clínica III
SDZ-EAA-494	Competitivo NMDA	Antiepiléptico	Clínica II
AY-12316	Competitivo NMDA	Neuroprotector	Preclínica
LY-274614	Competitivo NMDA	Antiepiléptico	Preclínica
MDL-100453	Competitivo NMDA	Antiepiléptico, neuroprotector	Preclínica
N7	Competitivo NMDA	Neuropatía	Preclínica
NPC-17742	Competitivo NMDA	Antiepiléptico, neuropatía, AA	Preclínica
D-cicloserina	Agonista glicina	Demencia	Clínica II
ACEA-1011	Antagonista glicina	Analgesia, AA	Preclínica
ACPC	Agonista glicina	Ataque apopléjico	Clínica I
7Cl-iokinurénico	Antagonista glicina	Neuroprotector	Preclínica
4Cl-iokinurénico	Antagonista glicina	Huntington	Preclínica
L-701.253	Antagonista glicina	Antiepiléptico	Preclínica
L-701.324	Antagonista glicina	Antipsicótico, analgésico	Preclínica
M-241249	Antagonista glicina	Ataque apopléjico	Preclínica
MDL-102288	Antagonista glicina	Neuroprotector, ansiolítico	Preclínica
GVS-111	Modulador NMDA	Aumento cognición	Preclínica
Eliprodil	Antagon poliaminas	Neuroprotector	Clínica II/III
LY-215490	Antagonista AMPA	Antiepiléptico	Clínica I
YM-900/YM90K	Antagonista AMPA	Ataque apopléjico	Clínica I
NBQX	Antagonista AMPA	Trauma	Preclínica
NS-377	Antagonista AMPA	Neuroprotector, demencia	Preclínica
SYM-2101	Agonista AMPA	Antiepiléptico, Ataque apopléjico	Preclínica
AMPAkines	Modulador+ AMPA	Demencia	Clínica I
IDRA-21	Modulador+ AMPA	Demencia	Preclínica
Lamotrigina	Inhibe liberac. GLU	Antiepiléptico	Mercado
Riluzole	Antagonista GLU ?	Demencia, antiepiléptico,	Clínica II/III
Ipenoxazona	Antagonista GLU ?	Demencia, antiespasmódico	Clínica II
BW-619C89	Inhibe liberac. GLU	Ataque apopléjico	Clínica II

varias neuropatologías agudas como la isquemia cerebral, el trauma con hipoxia, el choque hipoglucémico, el efecto de algunos neurotóxicos exógenos, condiciones patológicas que se han correlacionado con la liberación presináptica excesiva del GLU (Phillis y Walter, 1989; Zeevalk y Nicklas, 1990; Iversen y cols., 1994) o con la menor recaptura presináptica del GLU que, de comportarse como un aminoácido excitatorio, se convierte en un neurotransmisor excitotóxico que da lugar a la muerte neuronal (Greenamyre, 1986; Meldrum y Garthwaite, 1990; Meldrum, 1995; Zivin y Choi, 1991; Bullock y cols., 1995; Mody y McDonald, 1995). La disfunción de la neurotransmisión glutamatérgica también se relaciona con varias neuropatologías como la ansiedad, la epilepsia (Greenamyre, 1986; Dingledine y cols., 1990; Olney, 1990; Shin y cols., 1992; Lahtinen y cols., 1993; Danysz y cols., 1995; Meldrum, 1995; Dalby y Thomsen, 1996; McNamara, 1992 y 1993; Avoli, 1991), la enfermedad de Alzheimer (Greenamyre, 1986; Bowen, 1990; Danysz y cols., 1995; Lawlor y Davis, 1992; Greenamyre y cols., 1988; Hyman y cols., 1994), la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson (Carlsson y Carlsson, 1990) y la corea de Huntington (Nicoletti y cols., 1996; Olney, 1989). De hecho, la administración exógena de agonistas glutamatérgicos como el ácido kaínico que induce lesiones en las neuronas del cuerpo estriado, constituye un modelo experimental de la Corea de Huntington (Coyle y Schwarcz, 1976). La alteración en la neurotransmisión glutamatérgica, también está relacionada con enfermedades degenerativas de motoneuronas, como la esclerosis amiotrófica lateral y el neurolatirismo (Appel, 1993; Ammar y Nigel, 2000; Lorene y cols., 2000). Por la alta incidencia y la importancia que revisten estas patologías, se han realizado numerosos esfuerzos

para el desarrollo de nuevos fármacos como neuroprotectores, ansiolíticos, analgésicos, antiparkinsonianos, para el tratamiento de la demencia y la epilepsia, considerando como blanco farmacológico la neurotransmisión glutamatérgica, ya sea a nivel de la liberación del GLU o con el empleo de agonistas y antagonistas (TABLAS II, III y IV) de los diferentes tipos de receptores (Marini y cols., 2001; Iversen, 1994; Nicoletti y cols., 1996; Piomelli y cols., 2000; Danysz y cols., 1995).

2. Mecanismos de la neurotoxicidad con el GMS.

En la etapa neonatal la neurotoxicidad inducida por la administración exógena del GMS y de otros agonistas como el ácido kaínico, el ácido iboténico, el ácido quisquálico o el N-metil-D-aspartato (NMDA) se caracteriza por un prominente edema del soma neuronal y de las dendritas, dilatación del retículo endoplásmico, ruptura de la citoarquitectura acompañada con depleción de fosfatos de alta energía como el ATP y necrosis neuronal (Olney y cols., 1974; Kizer y cols., 1978; Schawarcz y cols., 1978; Zaczek y Coyle, 1982; Novelli y cols., 1988; Retz y Coyle, 1982; Coyle, 1983; Winn y cols., 1991; Young y cols., 1991). Los axones y elementos no neurales no son afectados. El efecto neurotóxico del GMS, el cual culmina con la muerte neuronal, se atribuye al efecto excitatorio mediado por sus receptores específicos, cuya concentración incrementada en la vecindad neuronal crea un estado de continua despolarización con un incremento sostenido de la permeabilidad membranal, un influjo pasivo de agua y un notable incremento de las concentraciones de Ca^{++} intracelular, lo que da lugar a la excitotoxicidad y a la muerte neuronal (Mody y McDonald, 1995; Rothman, 1992; Danysz y cols., 1995; Greenamyre, 1986; Meldrum, 1995). Adicionalmente, existe evidencia de que en la neurotoxicidad provocada por

los aminoácidos excitatorios, el estrés oxidativo desencadenado por la activación de los receptores específicos que generan especies reactivas de oxígeno contribuyen al efecto citolítico (Bondy y Lee, 1993; Cazevielle y cols., 1993; Dawson y cols., 1991 y 1993; Kiendrowsk y cols., 1992; Lafon-Cazal y cols., 1993).

La neurotoxicidad inducida por el GMS fue demostrada inicialmente en el pollo y en el ratón, este fenómeno se ha confirmado ampliamente en otras especies animales como la rata, el hamster, el cobayo, el conejo, el perro y en el mono (Heywood y Worden, 1979; Filer, 1979). Además, se ha demostrado en diversos modelos experimentales *in vitro* (Golzan y Ben-Ari, 1995; Porter y Roberts, 1993; Ishida y cols., 1993; Pauwels y Leysen, 1992; Matyja y Albretch, 1993; Bawin y cols., 1993; Dawson y cols., 1991 y 1993; Jacquin y cols., 1988).

La neurotoxicidad inducida en el periodo neonatal por la administración del GMS se ha caracterizado plenamente desde el punto de vista morfológico, neuroquímico, endocrino y metabólico y, en menor grado, desde el punto de vista conductual.

Dentro de las regiones cerebrales afectadas por la neurotoxicidad, se puede señalar a la eminencia media del hipotálamo, al núcleo arqueado del hipotálamo, el área postrema (Burden y cols., 1974; Jennes y cols., 1984; Katz, 1983; Krieger y Kizer, 1979; Meister y cols., 1989; Meister, 1991; Heywood y Worden, 1979; Olney, 1972; Olney, 1977; Fernstrom y Goldsmith, 1998; Miskowiak y cols., 1999; Morris y cols., 1998; Park y cols., 2000; Pelaez y cols., 1999; Tang-Christensen y cols., 1999; Nakagawa y cols., 2000), el órgano subfornical, el giro dentado, el colículo superior y diversas regiones de hipocampo y la retina (Lucas y Newhouse, 1957; Chambille y Serviere, 1993; Zeevalk y Nicklas, 1990; Kim y cols., 2000; Pauwels y Leysen, 1992; Bawin y cols., 1993; Kubo y cols., 1993; Mody y McDonald, 1995; Danysz y cols.,

1995; Ali y cols., 2000).

Las alteraciones endocrinas relacionadas con la neurotoxicidad provocada por el GMS incluyen modificaciones en la síntesis o liberación de varias hormonas como la adrenocorticotrófica (ACTH), la hormona del crecimiento, la estimulante del tiroides, la luteinizante, la estimulante del folículo y la insulina (Pelaez y cols., 1999; Jennes y cols., 1984; Scallet y Olney, 1986; Sterman y cols., 1988; Abe y cols., 1990; Antoni y cols., 1982; Balbo y cols., 2000; Meister y cols., 1989; Chambille y Serviere. 1993; Meister. 1991; Kubo y cols., 1993; Martinkova y cols., 2000; Miskowiak y cols., 1999; Mistlberger y Antle, 1999; Ali y cols., 2000; Iwase y cols., 1998; Stricker-Krongrad y cols., 1998; Tadokoro y cols., 1974; Tang-Christensen y cols., 1999; Tang-Christensen y cols., 1998; Tokarev y Jezova, 2000; Tokuyama y Himms-Hagen, 1986; Zelena y cols., 1998; Zhang y cols., 1988; Dolnikoff y cols., 2001); Fernstrom y Goldsmith, 1998; Iwase y cols., 1998). La serie de alteraciones endocrinas se manifiestan como hipotiroidismo, hipogonadismo y esterilidad; las alteraciones metabólicas dan lugar a la obesidad, disminución del crecimiento, alteraciones de la termorregulación, incremento de las concentraciones de triglicéridos; también ocurren modificaciones de conductas de aprendizaje, de la ingesta de agua y de alimento, de la actividad locomotora, de la conducta sexual y alteración de algunos ritmos circadianos.

Respecto a las alteraciones que se producen en diversos sistemas neurotransmisores en algunas regiones cerebrales, destacan las que ocurren en la actividad de enzimas limitantes de la biosíntesis, en la concentración de los neurotransmisores y en las enzimas que los metabolizan como la colinaacetiltransferasa y la acetilcolinesterasa en el caso de la acetilcolina; la

hidroxilasa de tirosina y la monoaminoxidasa en el caso de las catecolaminas (Walas y Fonum, 1978; Jennes y cols., 1984; Frieder y Grimm, 1987; Pittaluga y Raitieri, 1992; Balbo y cols., 2000; Nakagawa y cols., 2000) o en la descarboxilasa del ácido glutámico en el caso del GABA (Walas y Fonum, 1978; Jennes y cols., 1984; Di Giorgio y cols., 1985; Beas y cols., 1998). También se producen alteraciones en el sistema opiopeptidérgico en el núcleo arqueado del hipotálamo (Krieger y Kizer, 1979; Meister y cols., 1989; Romagnano, 1982; Bodnar y cols., 1985 y 1986; Katz, 1983) y en otros neuropéptidos (Abe y cols., 1990; Meister y cols., 1989; Jennes y cols., 1984; Morris y cols., 1998). Relacionado con lo anterior, se han descrito alteraciones en el número de receptores para hormonas, para algunos neurotransmisores como el GABA, la dopamina (DA), el propio GLU, el KA y para péptidos opioides en los cerebros de animales neurointoxicados con el aminoácido excitatorio (Fernstrom y Goldsmith, 1998; Walas y Fonum, 1978; Kovacs y cols., 2000; Young y cols., 1983; Hikiji y cols., 1993).

Adicionalmente, el hecho de que existan receptores periféricos al GLU, sugiere que tales macromoléculas periféricas sean blanco vulnerable a los efectos excitatorios y excitotóxicos del GMS.

En relación a la susceptibilidad que muestran los animales neurointoxicados con el GMS, se sabe que éstos son menos susceptibles al pentobarbital (Gómez y cols., 1991) y más susceptibles a las convulsiones inducidas por la estimulación eléctrica (Campos y cols., 1991; Wong y cols., 1993), así como a las provocadas químicamente con el metrazol (Campos y cols., 1994) y por el propio glutamato (Vargas, 1996). También las ratas neurointoxicadas muestran patrones de actividad eléctrica cerebral diferente cuando se estimula el hipocampo (Castellanos y cols.,

1994 y 1998). Se sabe, además, que los ratones neurointoxicados son más vulnerables al "kindling" químico inducido por el metrazol (Campos y cols., 1994; Castellanos y cols., 1998; Mori y cols., 1989; Schroder y cols., 1993). Asimismo existe evidencia de que el músculo liso intestinal proveniente de animales tratados neonatalmente con el GMS muestra alteraciones en la reactividad para algunos agonistas (Sukhanov y cols., 1999) e insulina (Macho y cols., 2000).

3. Fármacos depresores del SNC y neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica.

Los fármacos contemplados en el presente estudio (etanol, tiopental, fenobarbital, diazepam y GABA) pertenecen a distintos grupos químicos (excepto los barbitúricos fenobarbital y el tiopental) y tienen características farmacocinéticas diferentes; sin embargo, en términos generales tienen en común el mecanismo de acción, interactúan con el complejo macromolecular GABA_A-receptor-canal de cloro constituido por cinco subunidades ($\alpha 1$, $\beta 2$ y $\gamma 2$), incrementan la conductancia al cloro e induce la hiperpolarización neuronal, dando lugar a un potencial posináptico inhibitorio (PPSI) que se manifiesta como un efecto depresor del SNC. Dicho mecanismo de acción explica los efectos ansiolítico, sedantes-hipnóticos y anticonvulsivantes de este tipo de fármacos. así como algunos de los efectos colaterales que limitan en cierta medida su utilidad terapéutica (Goodman y cols., 2000; Trevor y Way, 2001).

En el caso del etanol, por mucho tiempo se consideró que sus efectos se ejercían a través de un mecanismo totalmente inespecífico. Al igual que otros depresores del SNC como los barbitúricos y los anestésicos generales, se proponía que, como resultado del coeficiente de partición lípido/agua alto, estos se disolvían y

fluidificaban o estabilizaban las membranas celulares e interferían con la función normal de los canales iónicos modificando la excitabilidad celular. Actualmente se acepta que, aún cuando no se ha identificado un receptor específico para el etanol, éste modifica la función de los canales iónicos dependientes de ligando, activados tanto por aminoácidos excitatorios como el GLU, como por aminoácidos inhibitorios como el GABA. En este sentido se sabe que el etanol, al igual que los neuroesteroides y algunos anestésicos generales, incrementa la inhibición sináptica mediada por el GABA a través de un sitio modulador del receptor al GABA_A e incrementa la conductancia al cloro (Nestoros, 1980; Ticku y Kulkarni, 1988; Korpi, 1994; Hevers y Luddens, 1998; Kricka y Clark, 1979; Goodman y cols., 2000). Desde el punto de vista farmacológico, los hechos que sustentan lo anterior es que otros agonistas GABAérgicos sinergizan los efectos del etanol y que los antagonistas del receptor GABA_A como la bicuculina inhiben el incremento de la conductancia al cloro e inhiben los efectos sedantes y atáxicos inducidos por el etanol. También existe evidencia de la participación de la neurotransmisión GABAérgica en el desarrollo de la tolerancia y de la dependencia física al etanol.

Respecto a las acciones del alcohol etílico sobre la neurotransmisión glutamatérgica, se sabe que la administración aguda del etanol interfiere con la actividad glutamatérgica al inhibir la actividad del receptor NMDA del GLU; en tanto que bajo el consumo crónico del alcohol, se produce una persistente inhibición del receptor NMDA lo que da lugar al desarrollo de supersensibilidad que se manifiesta cuando se suspende el consumo del etanol. En este sentido los efectos neurobiológicos del alcoholismo, como la intoxicación, las

manifestaciones del síndrome de abstinencia, el *delirium tremens*, el síndrome de Wernicke-Korsakoff y el síndrome alcohólico fetal, parece explicarse por las acciones del etanol sobre la neurotransmisión glutamatérgica (Hoffman y Tabakoff, 1994; Peoples y Tabakoff, 1994; Tsai y cols., 1995; Cummins y cols., 1990; Hoffman y cols., 1989; Nie y cols., 1993; Rassnick y cols., 1992; Goodman y cols., 2000; Trevor y Way, 2001; Alexander y cols., 2001).

En el caso de los barbitúricos como el fenobarbital, el pentobarbital y el tiopental podemos señalar que su mecanismo de acción también implica un incremento de la inhibición sináptica mediada por el GABA_A. Al respecto se sabe que los barbitúricos se unen a un sitio alostérico del receptor, lo que induce una facilitación GABAérgica inhibitoria. Los barbitúricos aumentan la duración de la apertura de los canales operados por el GABA y a concentraciones más altas activan directamente al canal de cloro. Este tipo de fármacos también interfieren con la acción de los aminoácidos excitatorios como el GLU; diferencialmente, el pentobarbital ejerce un efecto facilitador GABAérgico más eficaz que el fenobarbital y también inhibe los canales de Ca⁺⁺ operados por voltaje con una potencia mayor que el fenobarbital; el bloqueo de los canales de Ca⁺⁺, disminuye la entrada del ion a las terminaciones nerviosas presinápticas y la inhibición de la liberación de neurotransmisores como el GLU, con la subsecuente reducción de la transmisión excitatoria. Estas acciones de los barbitúricos explican el mayor efecto depresor sobre el SNC y el menor margen de seguridad en relación con las benzodiazepinas (Twyman y cols., 1989; French-Mullen y cols., 1993; Lesser y cols., 1999; Goodman y cols., 2000; Trevor y Way, 2001; Alexander y cols., 2001).

El mecanismo de acción de las benzodiazepinas, a diferencia del etanol y de los barbitúricos, implica su interacción con un sitio de unión específico al receptor del GABA (heterooligómero de cinco subunidades). Se sabe que se requiere de las subunidades α y γ para la unión de las benzodiazepinas. Mediante la clonación molecular y con el estudio de los receptores recombinantes se ha demostrado que el receptor a las benzodiazepinas es una parte integral del receptor al GABA. El resultado de la unión al receptor GABA_A, es un incremento en la facilitación GABAérgica en la conductancia al cloro. El efecto neto se debe a un incremento de la frecuencia de la descarga de apertura de los canales de cloro, activados por el GABA (Twyman y cols., 1989; Taukulis y Brake, 1986; Zorumsky e Isenberg, 1991; Woods y cols., 1992). Cabe señalar que existe otro tipo de receptor al GABA, el receptor GABA_B, que en contraste con el receptor el GABA_A, funcionalmente es un receptor metabotrópico acoplado a las proteínas G y constituido molecularmente de siete dominios transmembranales y cuyos agonistas son diferentes a las benzodiazepinas y a los barbitúricos (Bormann, 2000); más recientemente se ha descrito un receptor GABA_C con características moleculares y funcionales diferentes (Bormann, 2000; Zhang y cols., 2001).

III. JUSTIFICACION

Existe evidencia que señala que en la etapa neonatal de varias especies animales, la neurotoxicidad inducida por el GMS, se manifiesta como alteraciones neuroquímicas, neuroendocrinas, metabólicas y conductuales, sin embargo, hay poca información de los cambios en la susceptibilidad que muestran los animales neurointoxicados con el aminoácido excitatorio, a fármacos que se sabe ejercen sus efectos a través de la

interacción con los sistemas neurotransmisores afectados por la neurotoxicidad. Además, es importante destacar que el GMS posee propiedades únicas como saborizante y que este producto se adiciona intencionalmente a diversos productos destinados al consumo humano (aditivo alimentario), lo que le otorga al estudio, aparte del enfoque mecanicista, un enfoque eminentemente farmacotológico.

IV. HIPOTESIS.

Si en el periodo neonatal de los roedores la neurotoxicidad inducida por el GMS provoca alteraciones permanentes en la neurotransmisión GABAérgica, se espera que existan modificaciones en la susceptibilidad a los fármacos que ejercen sus efectos a través de la interacción con los sistemas GABAérgicos.

V. OBJETIVO GENERAL.

Determinar los cambios en la susceptibilidad de los ratones adultos neurointoxicados en la etapa neonatal con el GMS a algunos agonistas GABAérgicos, como: el etanol, el tiopental, el fenobarbital, el diazepam y al GABA.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Inducir neurotoxicidad en roedores (rata y ratón) con la administración subcutánea del GMS en el periodo neonatal.
2. Determinar si los animales intoxicados con GMS, en la etapa neonatal, muestran, en la edad adulta, cambios en la susceptibilidad al efecto depresor, hipotérmico y letal a algunos agonistas GABAérgicos (etanol, tiopental, fenobarbital, diazepam y el GABA) en la edad adulta, bajo condiciones de administración aguda.

3. Estudiar si los ratones neurointoxicados con GMS, en la etapa neonatal, muestran modificaciones en la susceptibilidad a los efectos depresor, hipotérmico y letal de los agonistas GABAérgicos señalados, bajo condiciones de administración crónica (durante 30 días), así como estudiar su influencia sobre el consumo de agua y alimento y sobre el peso corporal.
4. Determinar si la expectativa de vida de los ratones neurointoxicados con el GMS se modifica.
5. Estudiar el perfil citológico vaginal durante 30 días de ratas adultas neurointoxicadas neonatalmente con GMS.
6. Determinar si existen modificaciones en las concentraciones cerebrales de GABA en los animales neurointoxicados respecto a los controles..
7. Determinar si existen diferencias en las curvas de la evolución temporal de las concentraciones sanguíneas del etanol en el ratón neurointoxicado con el GMS, respecto al control.
9. Inferir, con base en los resultados, si los cambios en la susceptibilidad a los fármacos estudiados están relacionados con modificaciones en los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos inducidos por el neurotóxico.

VII. MATERIAL Y METODOS

1. Animales

Los experimentos del presente estudio se realizaron con ratones de la cepa CFW obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM y clínicamente sanos. Los animales se aparearon en jaulas de acrílico (16 cm de ancho x 20 cm de largo x 15 cm de alto), provistas de cama de viruta esterilizada, a razón de cuatro hembras

adultas de 25 a 30 g de peso corporal por cada macho adulto de 25 a 30 g de peso. y se mantuvieron en óptimas condiciones higiénicas; también se mantuvieron en condiciones ambientales controladas de temperatura (20 ± 2 °C) y de humedad relativa ($55 \pm 3\%$) e iluminación (ciclos de luz-obscuridad, 12 x 12 h) y con acceso libre al agua y al alimento (Purina Chow, St. Louis, Mo). Una vez confirmado que las hembras quedaron preñadas, se colocaron individualmente en las jaulas de acrílico con las dimensiones señaladas anteriormente y se estuvo atento al día del nacimiento.

También se emplearon ratas macho y hembras de 200 a 250 g de peso, de la cepa de Wistar; se aparearon a razón de tres hembras por un macho y fueron colocadas en jaulas de acrílico (55 cm de largo x 31 cm de ancho x 21 cm de alto). Los estudios fueron desarrollados siguiendo las normas internacionales para la investigación biomédica con animales (OPS, 1990) y de acuerdo a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, NOM-062-ZOO-1999 (Diario Oficial de la Federación, 2001).

2. Procedimiento para inducir la neurotoxicidad con el GMS.

El día del nacimiento, las diferentes camadas de rata y ratón se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos: I. Experimental (neurointoxicados con el GMS) y II. Control (con solución salina isotónica).

El grupo I recibió por vía subcutánea 2 mg/g de peso corporal de GMS (Sigma Chemical) disuelto en agua destilada el segundo y cuarto día posnatal, y 4 mg/g de peso corporal, el sexto, octavo y décimo día posnatal (Meister y cols., 1989; Chambille y Serviere, 1993; Meister, 1991). El grupo II fue inyectado con el volumen equivalente

de la solución salina. En todos los casos el volumen administrado fue de 0.01 ml/g. A las cuatro semanas, los animales fueron destetados, sexados y marcados de manera permanente (los animales del grupo experimental en la oreja derecha y los controles en la oreja izquierda) colocando en jaulas de acrílico, diez animales por jaula (55 cm de largo x 31 cm de ancho x 21 cm de alto). En la edad adulta (20 a 25 semanas de edad) se realizaron los estudios de susceptibilidad aguda y crónica a los agonistas GABAérgicos contemplados en el estudio (etanol, tiopental, fenobarbital, diazepam); en el caso del GABA sólo se realizó el estudio de susceptibilidad aguda.

3. Estudios de susceptibilidad a los agonistas GABAérgicos.

A. Susceptibilidad bajo la administración aguda y crónica de etanol

Tanto en los ratones neurointoxicados (grupo I) como en los del grupo control (grupo II) se realizaron curvas de dosis respuesta a los efectos hipotérmico, hipnótico y letal del etanol administrado agudamente por vía intraperitoneal a varias dosis (2.0, 2.6, 3.0 y 3.5 g/kg). Se emplearon 10 ratones macho por cada dosis y grupo. El etanol se administró a intervalos de un minuto e inmediatamente se colocaron los animales en recipientes de vidrio para su observación continua durante las primeras cuatro horas. Se determinó la duración del efecto hipnótico (considerado desde el momento de la pérdida del reflejo de enderezamiento, hasta su recuperación) y se registró la temperatura rectal basal (antes de la administración del alcohol) a través de un teletermómetro rectal (YSI instruments) a los 30, 60 y 120 min después de la administración del etanol, así como la letalidad ocurrida en las primeras cuatro horas de observación y posteriormente cada 24 horas durante ocho días.

Para los estudios de susceptibilidad bajo condiciones de administración crónica del

etanol. a un lote de 20 ratones macho neurointoxicados neonatalmente con el GMS (Grupo I) y otro de 20 ratones macho control (Grupo II), se les administró por vía oral durante 30 días una dosis de 2.5 g/kg de etanol cada 24 horas (entre las 13:00 y 14:00 hs). En todos los casos los animales fueron pesados diariamente en una balanza digital (Ohaus, Galaxy 1200). Se midió diariamente la temperatura rectal antes (basal) y a los 30, 60 y 120 minutos después de la administración del etanol y se registró la letalidad acumulada ocurrida durante los 30 días de tratamiento.

B. Susceptibilidad bajo la administración aguda y crónica de tiopental

Tanto en los animales neurointoxicados (grupo I) como en los animales control (grupo II), se realizaron curvas-dosis respuesta a los efectos hipotérmico, hipnótico y letal del tiopental administrado agudamente, por vía intraperitoneal, a varias dosis (75, 150, 200 y 300 mg/kg). Se emplearon diez animales macho por dosis y grupo. El tiobarbitúrico se administró a intervalos de un minuto e inmediatamente los animales se colocaron en recipientes de vidrio para su observación continua durante las primeras cuatro horas. Se anotó la duración del efecto hipnótico (considerado desde el momento de la pérdida del reflejo de enderezamiento, hasta su recuperación), la temperatura rectal basal (antes de la administración del barbitúrico) a través de un teletermómetro rectal (YSI instruments) y a los 30, 60 y 120 min después de la administración del depresor del SNC, y la letalidad ocurrida en las primeras cuatro horas de observación y posteriormente cada 24 h durante ocho días.

Para los estudios de susceptibilidad bajo condiciones de administración crónica, a un lote de 15 ratones macho neurointoxicados neonatalmente con el GMS (grupo I) y otro de 15 ratones macho control (grupo II), se les administró por vía oral una dosis

de 100 mg/kg de tiopental sódico (Abbot) cada 24 h, entre las 13:00 y 14 00 h. durante 30 días. Los animales fueron pesados diariamente en una balanza digital (Ohaus. Galaxy 1200). Se midió diariamente la temperatura rectal antes (basal) y a los 30, 60 y 120 min después de la administración del tiopental; también se registró la letalidad acumulada, ocurrida durante los 30 días del estudio.

C. Susceptibilidad bajo la administración aguda y crónica de fenobarbital

Tanto en los animales neurointoxicados (grupo I) como en los animales control (grupo II), se realizaron curvas-dosis respuesta a los efectos hipotérmico, hipnótico y letal del fenobarbital administrado agudamente, por vía intraperitoneal, a varios niveles de dosis (50, 100, 200 y 300 mg/kg). Se emplearon 10 animales macho por nivel de dosis y por grupo.

El oxibarbitúrico se administró a intervalos de un minuto e inmediatamente los animales se colocaron en recipientes de vidrio para su observación continua durante las primeras cuatro horas. Se anotó la duración del efecto hipnótico (considerado desde el momento de la pérdida del reflejo de enderezamiento, hasta su recuperación), se registró la temperatura rectal basal (antes de la administración del barbitúrico) a través de un teletermómetro rectal (YSI instruments) y a los 30, 60 y 120 min después de la administración del depresor del SNC. Se registró la letalidad ocurrida en las primeras cuatro horas de observación y posteriormente cada 24 h durante ocho días.

Para los estudios de susceptibilidad bajo condiciones de administración crónica, a un lote de 10 ratones macho neurointoxicados neonatalmente con el GMS (grupo I) y otro de 13 ratones macho control (grupo II), se les administró por vía oral, una dosis

de 100 mg/kg de fenobarbital cada 24 h, entre las 13:00 y 14:00 h. durante 30 días. Los animales fueron pesados diariamente en una balanza digital (Ohaus. Galaxy 1200). Se midió diariamente la temperatura rectal antes (basal) y a los 30, 60 y 120 min después de la administración del barbitúrico; también se registró la letalidad acumulada, ocurrida durante los 30 días del estudio.

D. Susceptibilidad bajo la administración aguda y crónica de diazepam

Tanto en los animales neurointoxicados (grupo I) como en los animales control (grupo II), se realizaron curvas-dosis respuesta a los efectos hipotérmico, hipnótico y letal del diazepam administrado agudamente, por vía intraperitoneal, a varios niveles de dosis (12.5, 25 y 50 mg/kg). Se utilizaron entre 7 y 10 animales macho por dosis y por grupo. El diazepam se administró a intervalos de un minuto e inmediatamente los animales se colocaron en recipientes de vidrio para su observación continua durante las primeras cuatro horas. Se anotó la duración del efecto hipnótico (considerado desde el momento de la pérdida del reflejo de enderezamiento, hasta su recuperación), se registró la temperatura rectal basal (antes de la administración del fármaco a través de un teletermómetro rectal (YSI instruments) y a los 30, 60 y 120 min después de la administración del agonista GABAérgico. Se registró la letalidad ocurrida en las primeras cuatro horas de observación y posteriormente cada 24 h durante ocho días.

Para los estudios de susceptibilidad bajo condiciones de administración crónica, a un lote de 10 ratones hembra neurointoxicados neonatalmente con el GMS (grupo I) y otro de 10 ratones hembra control (grupo II), se les administró por vía oral una dosis de 12.5 mg/kg de diazepam cada 24 h, entre las 13:00 y 14:00 h, durante 30 días.

Los animales fueron pesados diariamente en una balanza digital (Ohaus. Galaxy 1200). Se midió diariamente la temperatura rectal antes (basal) y a los 30, 60 y 120 min después de la administración del diazepam; también se registró la letalidad acumulada, ocurrida durante los 30 días del estudio.

E. Susceptibilidad bajo la administración aguda del GABA

Tanto en los animales neurointoxicados (grupo I) como en los animales del grupo control (grupo II), se realizaron curvas-dosis respuesta al efecto letal del GABA, administrado agudamente por vía intracerebral a varias dosis (250, 300 y 400 µg/5µl). La razón por la que se administró el GABA por esta vía es que el neurotransmisor no atraviesa la barrera hematoencefálica. Se utilizaron 10 animales macho por dosis y por grupo. El GABA se administró a intervalos de dos minutos e inmediatamente los animales se colocaron en recipientes de vidrio para su observación continua durante las primeras cuatro horas. Se registró la letalidad ocurrida en las primeras cuatro horas de observación y posteriormente cada 24 h durante ocho días.

4. Determinación de las concentraciones cerebrales de GABA.

Un grupos de diez animales macho neurointoxicados neonatalmente con el GMS y 10 del grupo control, se pesaron y se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se extrajo el cerebro (Glowinsky & Iversen, 1966) y se pesó en una balanza analítica (Mettler). El tejido se homogeneizó (Thomas) con 5 ml de etanol al 75% (Merck) a una velocidad media (homogeneizador Virtis) durante 50 a 60 segundos, en baño de hielo. Al tejido homogeneizado se le adicionó valina (1 mg/g de tejido fresco) como

estándar interno y se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 min a 10 °C (Centrífuga Refrigerada Sorvall). Del sobrenadante se tomaron cuatro alícuotas de 200 µl, a una de ellas se le adicionó GABA (5 µg/5µl). Las muestras se evaporaron a sequedad con nitrógeno a 50 °C. A las muestras desecadas se les adicionó la mezcla de reacción para la derivatización con dansilo (50 µl de NaHCO₃ al 0.84% y 125 µg de cloruro de dansilo, disuelto en 100 µl de acetona), los tubos de reacción se colocaron en un block térmico (90 °C) durante 15 min, se enfriaron y se inyectaron 5 µl al cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, Waters), equipado con una bomba 590, inyector U6K, una columna Symmetry-C₈ de fase reversa, un detector UV 490 e integrador 70. Como fase móvil se empleó una mezcla de acetonitrilo:agua (70:30), pH: 3.3-3.5; la velocidad de flujo fue de 1.5 ml/min y el efluente de la columna fue registrado a una longitud de onda de 254 nm (Zecca y cols., 1982). Se obtuvieron los cromatogramas, se midieron las alturas de los picos y se calcularon las concentraciones del GABA, las que se expresan en µg/g de tejido cerebral húmedo.

5. Determinación de las concentraciones sanguíneas de etanol.

Para la determinación de la curva de evolución temporal de las concentraciones sanguíneas del etanol, a un grupo de cinco ratones macho neurointoxicados neonatalmente con el GMS y a otro de cinco animales control, se les administró por vía oral 2.5 g/kg de etanol disuelto en agua destilada, en un volumen de 10 ml/kg de peso corporal. Previa dilatación de las venas de la cola con agua a 40 °C, se obtuvieron muestras de 100 µl de sangre a los 15, 30, 60 y 120 min posteriores a la administración del etanol. Se colocaron en viales heparinizados, se adicionó el

estándar interno (isopropanol) y se cerraron herméticamente. Los viales se sonicaron por 15 min e inmediatamente se sometieron a baño maría (70 °C por 15 min) para lograr la estabilización de la fase gaseosa. De la cabeza de la fase gaseosa se inyectó un mililitro al cromatógrafo de gases (Varian 3200) equipado con un detector de ionización de flama y una columna de acero inoxidable de dos milímetros de diámetro y empacada con Porapak Q80-100 mesh (Jones y Schubert, 1989).

Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases fueron:

Temperatura del inyector: 220 °C; Temperatura del detector: 220 °C; Temperatura del horno: 170 °C; Tiempo de corrida de cada muestra: seis minutos; Flujo del gas acarreador (Nitrógeno, Infra): 30 ml/min; Flujo de aire: 300 ml/min; Flujo de hidrógeno: 30 ml/min.

Se empleó como estándar interno el isopropanol y el tiempo de retención fue de 2.82 minutos para el etanol y de 4.60 minutos para el isopropanol. Se obtuvieron los cromatogramas, se midieron las alturas de los picos y se calcularon las concentraciones del etanol, las que se expresan en mg/dl de sangre.

6. Análisis estadístico de los resultados

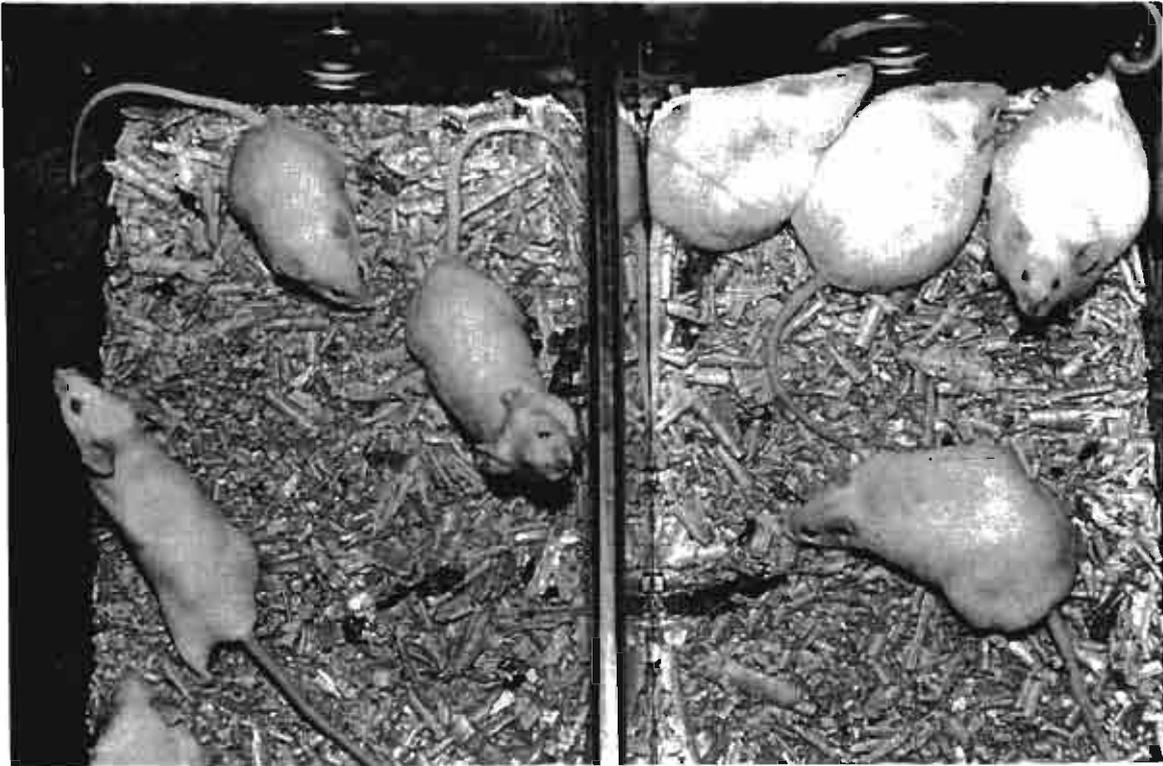
Los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis estadístico apropiado, dependiendo de la variable estudiada. Para las variables continuas como la temperatura rectal, el peso corporal, la duración del efecto hipnótico, las concentraciones cerebrales de GABA y las concentraciones sanguíneas de etanol, el análisis comparativo entre los grupos control y el experimental se realizó con una ANOVA, seguida de una prueba paramétrica de t de Student para grupos independientes. Para la comparación entre los grupos de las variables discontinuas,

como el porcentaje de animales que mostraron el efecto hipnótico y letal, se utilizó la prueba no paramétrica de Chi-cuadrada. Todas las pruebas estadísticas fueron de dos vías. El análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS (SPSS, Chicago). La Dosis Hipnótica Cincuenta (DE_{50H}) y la Dosis Letal Cincuenta (DL_{50}) fueron calculadas por el método de Litchfield y Wilcoxon (Litchfield y Wilcoxon, 1949), con los límites de confianza al 95%. Cuando no fue posible la aplicación del método de Litchfield y Wilcoxon para el cálculo de las DE_{50} por falta de datos, se recurrió al método gráfico Log-probits (Miller y Tainter, 1944). En todos los casos los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

VIII. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio señalan que es posible inducir neonatalmente la neurotoxicidad con el GMS en el ratón, empleando los esquemas de dosis reportados en la literatura. Como se puede apreciar en la Figura 1, los ratones neurointoxicados muestran las características anatómicas, también se presentaron las alteraciones conductuales ya reportadas por diversos autores. Tales manifestaciones en su conjunto, incluyen: excesiva obesidad, acortamiento de la longitud del cuerpo, acortamiento de la cola y pasividad (Olney, 1969; Kizer y cols., 1978; Meister y cols., Meister, 1991; Chambille y Serviere, 1993). Los animales también presentaron lesión retiniana y criptorquidia en el caso de los machos, como consecuencia de las alteraciones endocrinas. En un grupo de 20 ratones macho neurointoxicados y seleccionados aleatoriamente y en otro grupo de 20 controles, el peso corporal promedio en la edad adulta (20 semanas) fue de 55 ± 5.64 g para el grupo neurointoxicado con el GMS (Figura 1A) y de 43 ± 4.28 g para el grupo control (Figura 1B). Esta serie de manifestaciones, en su conjunto constituyen el "síndrome del glutamato monosódico" y se considera como la evidencia de que el GMS indujo la neurotoxicidad.

En la Figura 2 se muestra la evolución temporal del crecimiento ponderal, durante sesenta semanas, de un grupo de 19 ratones macho neurointoxicados neonatalmente con el GMS y de 18 ratones macho del grupo control, que fueron seleccionados aleatoriamente al momento del sexado y el destete. Como se puede observar, en las primeras semanas el promedio del peso corporal del grupo neurointoxicado



A

B

FIGURA 1. FOTOGRAFIA REPRESENTATIVA DE LAS CARACTERISTICAS QUE MUESTRAN LOS ANIMALES ADULTOS NEUROINTOXICADOS NEONATALMENTE CON EL GMS (B), EN RELACION CON LAS CARACTERISTICAS QUE PRESENTAN LOS ANIMALES CONTROL (A). EL PESO PROMEDIO DE LOS ANIMALES NEUROINTOXICADOS FUE DE 55.0 ± 5.64 Y EL DEL GRUPO CONTROL 43.8 ± 4.28 g. EN LA IMAGEN SE APRECIA COMO CARACTERISTICAS DISTINTIVAS: OBESIDAD, ACORTAMIENTO DE LA LONGITUD DEL CUERPO, ACORTAMIENTO DE LA COLA Y PASIVIDAD; ADEMAS PRESENTAN CRIPTORQUIDIA (QUE NO SE APRECIA EN LA IMAGEN)

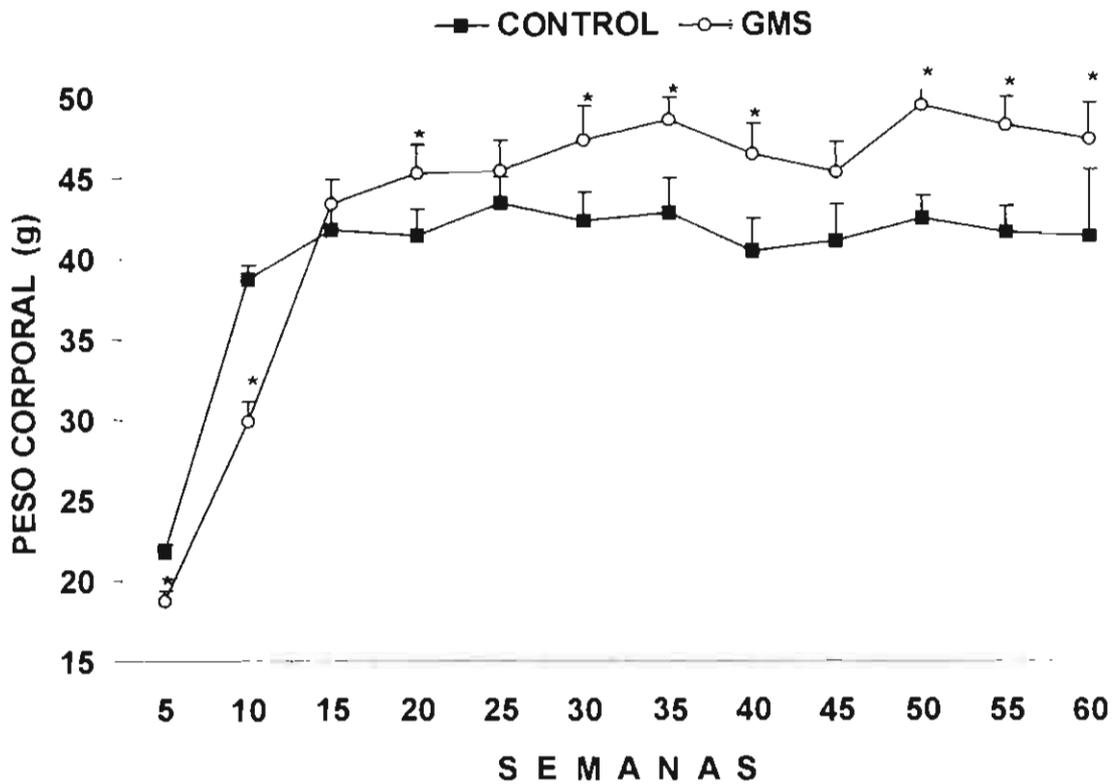


Figura 2. Evolución temporal del crecimiento ponderal, durante sesenta semanas, en el grupo de ratones control y en el grupo de animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS (n de 18 y 19 ratones macho por grupo). Los resultados se expresan como el promedio \pm EE. *p < 0.05

neonatalmente con el GMS, estuvo por debajo del peso corporal del grupo control y a partir de la semana 15, el peso corporal de los controles se estabiliza en tanto que el peso corporal del grupo neurointoxicado tiende a incrementarse significativamente ($p < 0.05$).

En este mismo grupo de ratones se realizó el seguimiento de la expectativa de vida, registrando cada semana las muertes ocurridas en ambos grupos de animales, dicho seguimiento se realizó durante 78 semanas (año y medio). Como se puede apreciar en la Figura 3, sorprendentemente los animales neurointoxicados con el GMS viven más tiempo y a pesar de la serie de alteraciones aparentemente se encuentran en mejores condiciones físicas que los ratones del grupo control. A las sesenta semanas ya habían muerto más del 95 de los animales control en tanto que sólo el 50% de los animales neurointoxicados había fallecido para ese tiempo (Figura 3); a las 78 semanas del seguimiento el 100% de los animales del grupo control murió, al igual que el 82% del grupo de animales neurointoxicados con el GMS. Estos hallazgos fueron confirmados en otros experimentos diseñados para otros propósitos.

En relación a la susceptibilidad que presentaron los ratones a los efectos agudos del etanol, como se aprecia en la Figura 4, los animales neurointoxicados fueron significativamente ($p < 0.05$) más susceptibles al efecto hipotérmico, respecto al grupo control; en algunos casos la temperatura rectal se redujo hasta en diez grados centígrados. También se observó una tendencia a la recuperación de la temperatura rectal en el caso de los animales del grupo control, particularmente a los 120 minutos. En contraste, para el grupo de animales neurointoxicados con el aminoácido excitatorio, el severo efecto hipotérmico persiste a las dos horas. Los cambios en la susceptibilidad

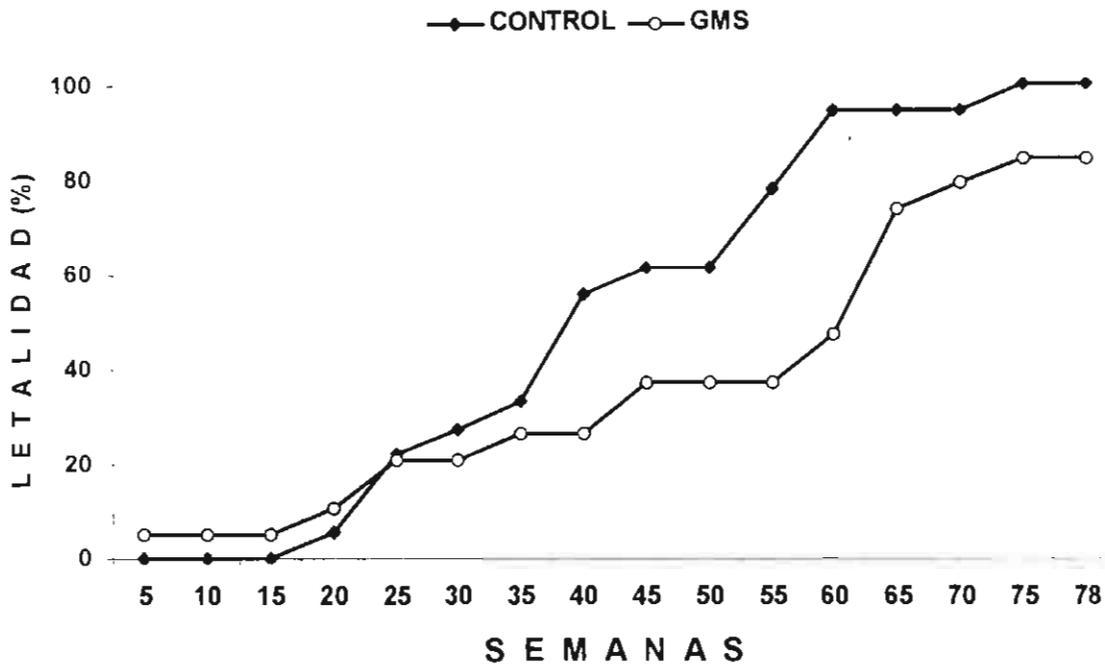


Figura 3. Seguimiento de la expectativa de vida presentada como la letalidad acumulada ocurrida durante 78 semanas (año y medio) en 19 ratones macho neurointoxicados neonatalmente con el GMS y en 18 ratones del grupo control. La letalidad se registró cada tercer día durante las 78 semanas. En la gráfica se presenta el porcentaje de letalidad acumulada cada cinco semanas, para ambos grupos.

■ CONTROL □ GMS

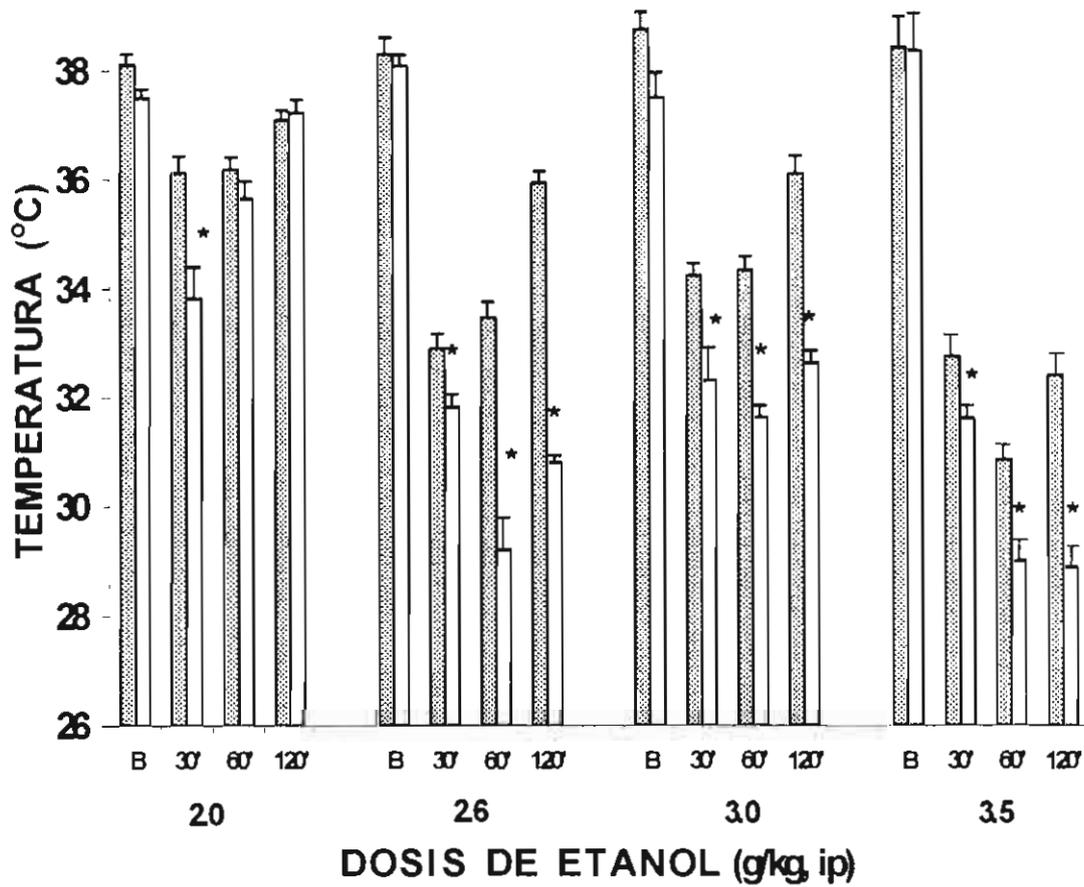


Figura 4. Evolución temporal, durante 120 minutos del efecto hipotérmico inducido por la administración aguda de etanol por vía intraperitoneal, a varias dosis, en ratones tratados neonatalmente con GMS. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm EE (n = 10). * p < 0.05.

a la duración de este efecto hipnótico del depresor del SNC se observan en la Figura 5. Los animales que fueron neurointoxicados neonatalmente con el GMS fueron significativamente más susceptibles ($p < 0.05$) al efecto depresor del alcohol, indicada por una mayor duración del efecto hipnótico, en relación a los grupos control. La representación del efecto hipnótico en terminos cuantales, se muestra en la Figura 6 se aprecia un desplazamiento de la curva dosis-respuesta a la izquierda del grupo GMS. respecto al grupo control; la DE_{50} hipnótica fue de 2.41 y de 5.04 g/kg, para respectivamente el grupo neurointoxicado y el grupo control (TABLA V). En relación a la susceptibilidad al efecto letal agudo del etanol, nuevamente se observó que el grupo de animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS, fueron claramente más susceptibles, en relación al grupo control (Figura 7). La DL_{50} para el grupo tratado con el GMS fue de 2.67 g/kg, en tanto que la DL_{50} para el grupo control no se pudo calcular por el método de Litchfield y Wilcoxon, por falta de datos de mortalidad (TABLA V).

TABLA V. Valores de la Dosis Efectiva Cincuenta Hipnótica (DE_{50H}) y de la Dosis Letal Cincuenta (DL_{50}) del etanol administrado por vía intraperitoneal a los ratones del grupo control y a los animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS. Entre paréntesis se muestran los límites de confianza al 95% (Litchfield & Wilcoxon, 1949).

GRUPOS	DE_{50H} (g/kg, ip)	DL_{50} (g/kg, ip)
CONTROL	5.04 (3.56-7.14)	-----
GMS	2.41 (2.16-2.69)	2.67 (2.32-3.09)

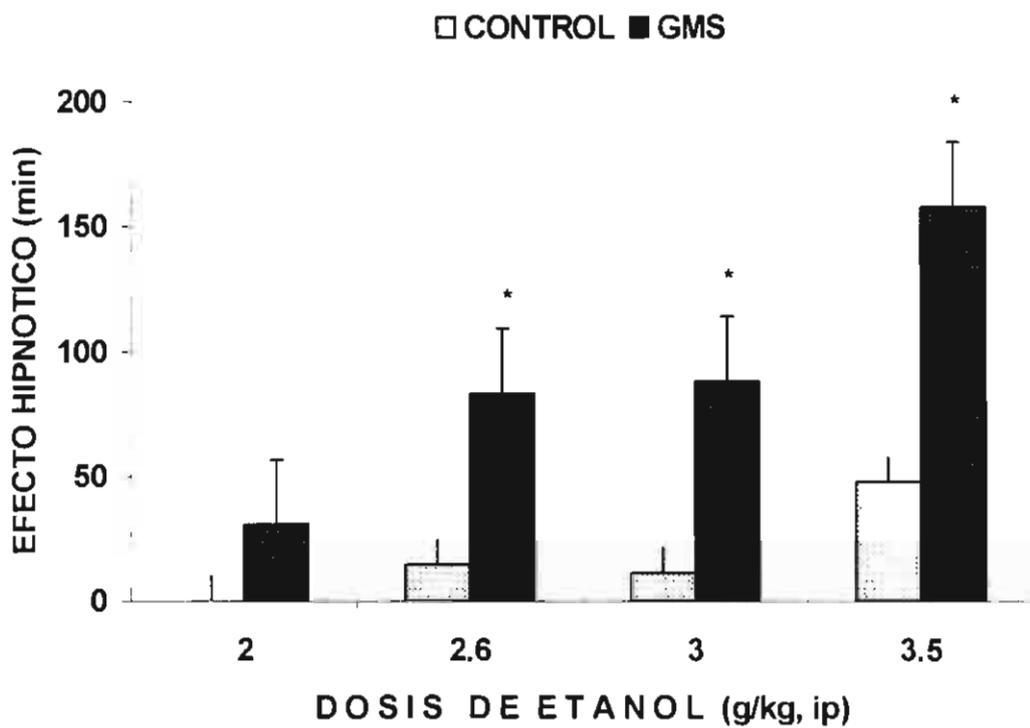


Figura 5. Curva dosis-respuesta del efecto hipnótico inducido por el etanol en animales pretratados neonatalmente con solución salina o con GMS. Los resultados se expresan como el promedio \pm EE de la duración del efecto hipnótico (n de 10 animales por dosis y grupo). *p < 0.05

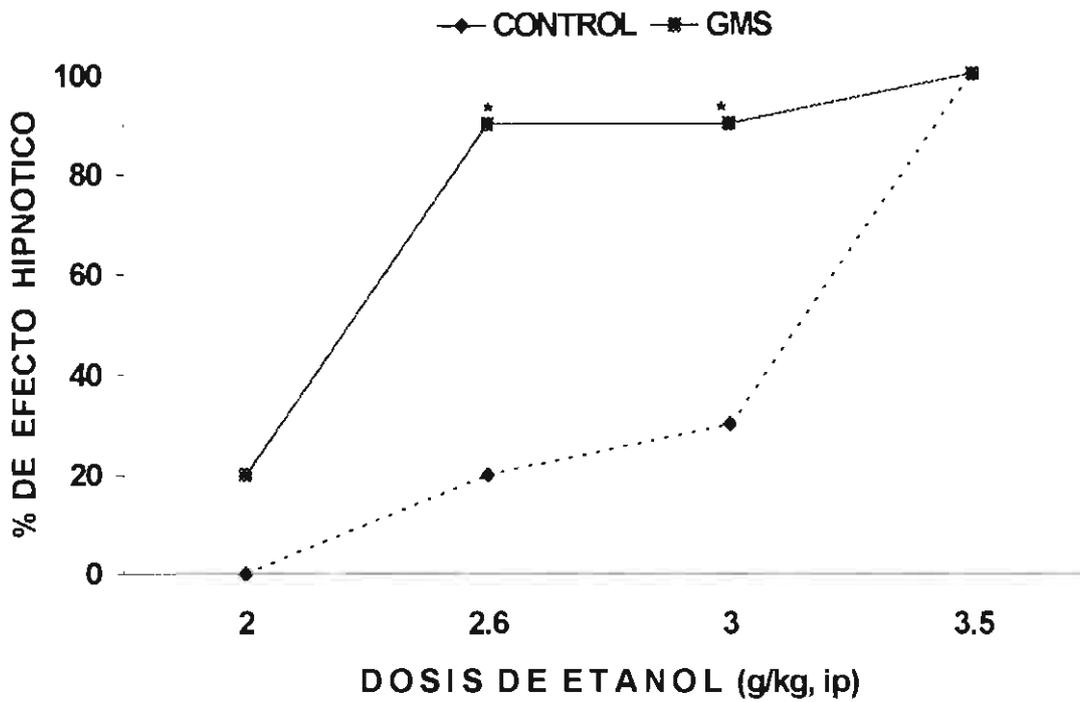


Figura 6. Influencia del tratamiento neonatal con GMS o con solución salina sobre la susceptibilidad al efecto hipnótico inducido por el etanol. Los resultados se expresan en porcentaje de animales que mostraron el efecto hipnótico (n de 10 animales por dosis y grupo). * $p < 0.05$.

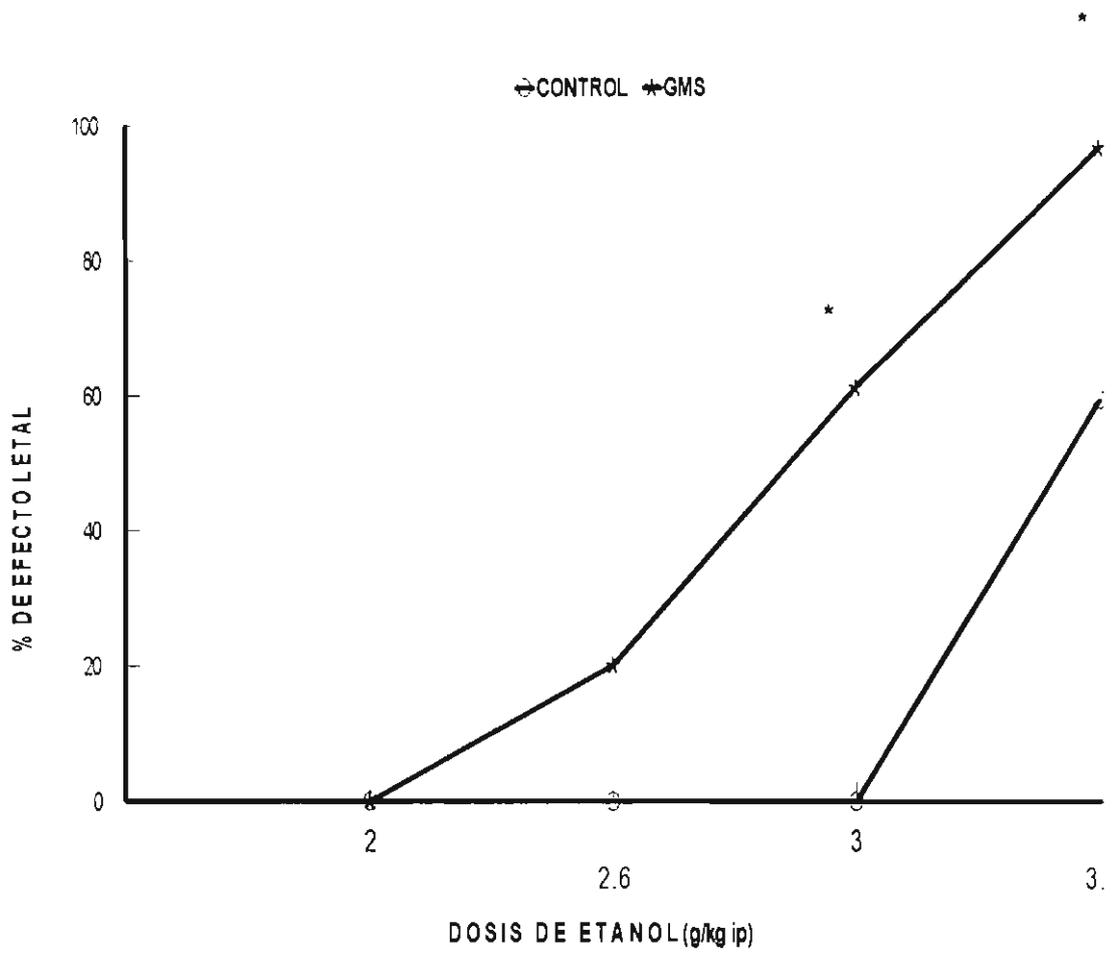


Figura 7. Curva dosis-respuesta al efecto letal inducido por el etanol administrado por vía intraperitoneal en ratones neurointoxicados neonatalmente con GMS o en los pretratados con solución salina. Los resultados se expresan en porcentaje de animales que murieron (n de 10 animales por dosis y grupo). *p < 0.05

El análisis cuantitativo de los resultados del estudio de susceptibilidad a la administración crónica (30 días) del etanol, por vía oral, a una dosis 2.5 g/kg, reflejan diferencias significativas entre los animales neurointoxicados y los animales del grupo control, para las diferentes variables estudiadas. En la Figura 8 se observa que, en términos generales los animales neurointoxicados fueron significativamente ($p < 0.05$) más vulnerables al efecto hipotérmico del etanol, en relación a los animales control.

El análisis de la evolución temporal del peso corporal durante los treinta días de tratamiento con el alcohol, muestra una drástica caída del peso corporal de los animales tratados con GMS (Figura 9), en tanto que el grupo control muestra una caída inicial moderada durante los primeros cinco a seis días y se mantiene a lo largo del tratamiento crónico con el etanol. Cabe destacar que de los animales tratados neonatalmente con el GMS y que sobrevivieron a los 30 días de tratamiento con el etanol, pesaban en promedio menos de 26 g, lo que significa una pérdida de más del 50% del peso corporal inicial. El promedio del peso corporal de los animales experimentales fue de 55 ± 5.64 g al inicio del tratamiento crónico con el alcohol y de 43 ± 4.28 g para el grupo control, diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

En relación a la letalidad acumulada durante los 30 días de tratamiento con el depresor del SNC, se aprecia que los ratones neurointoxicados con el GMS, fueron significativamente ($p < 0.05$) más sensibles al efecto letal del agonista GABAérgico, respecto a la susceptibilidad que mostraron los animales del grupo control (Figura 10).

Respecto a los resultados de susceptibilidad que presentaron los ratones a los efectos agudos del tiopental, como se aprecia en la Figura 11, los animales neurointoxicados

■ CONTROL □ GMS

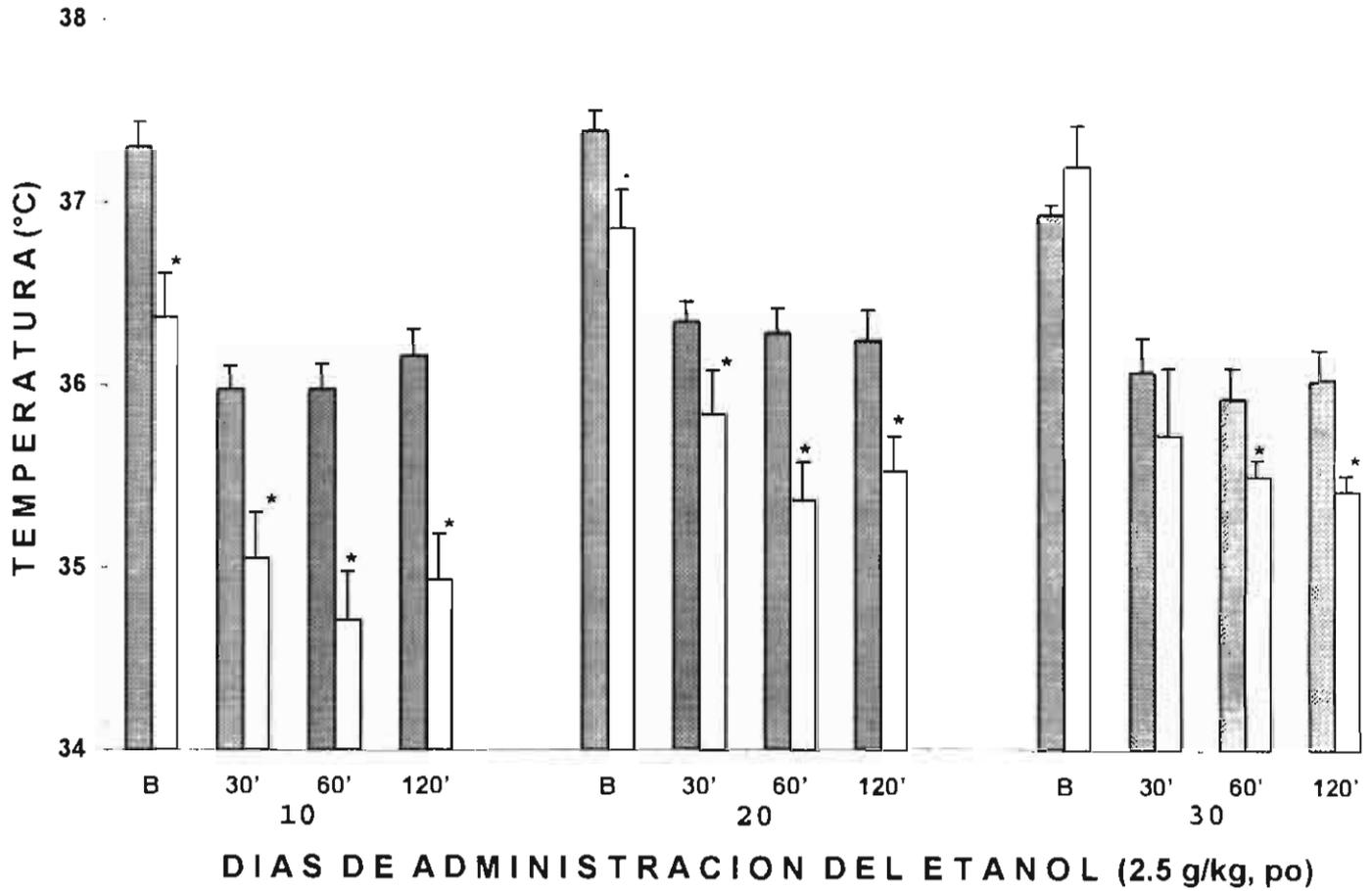


Figura 8. Influencia del tratamiento neonatal con GMS o con solución salina, sobre la evolución temporal, durante 120 minutos, del efecto hipotérmico inducido por la administración crónica (una dosis cada 24 hs) de etanol (2.5 g/kg, po) durante 30 días. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm ET de la temperatura rectal acumulada para 10, 20 y 30 días de administración del etanol (n de 20 ratones por grupo). * $p < 0.05$.

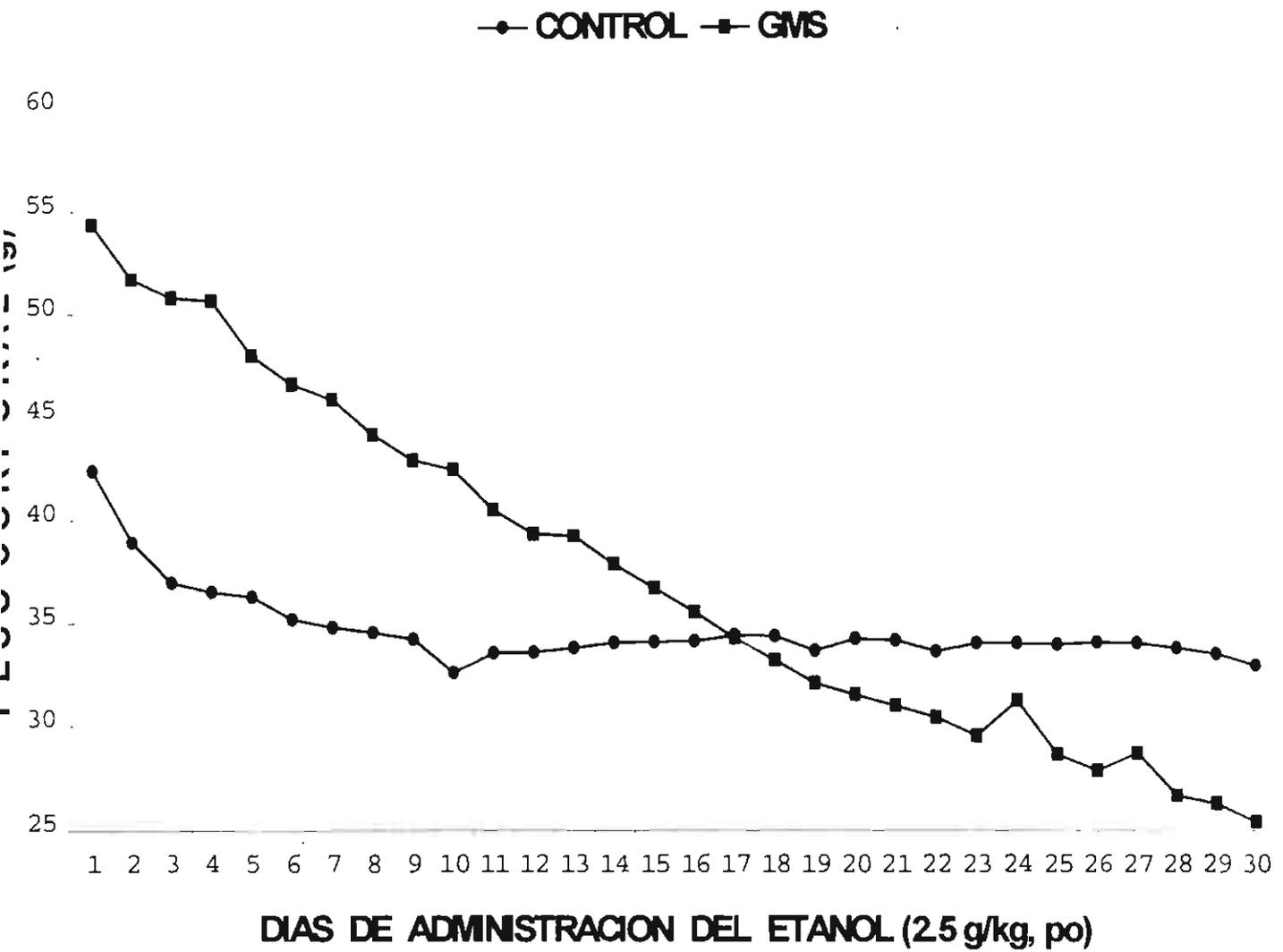


Figura 9. Influencia de la neurotoxicidad inducida neonatalmente con el GMS o del tratamiento con solución salina sobre las modificaciones del peso corporal provocadas por la administración crónica (una dosis cada 24 h) del etanol, durante 30 días (n de 20 animales por grupo).

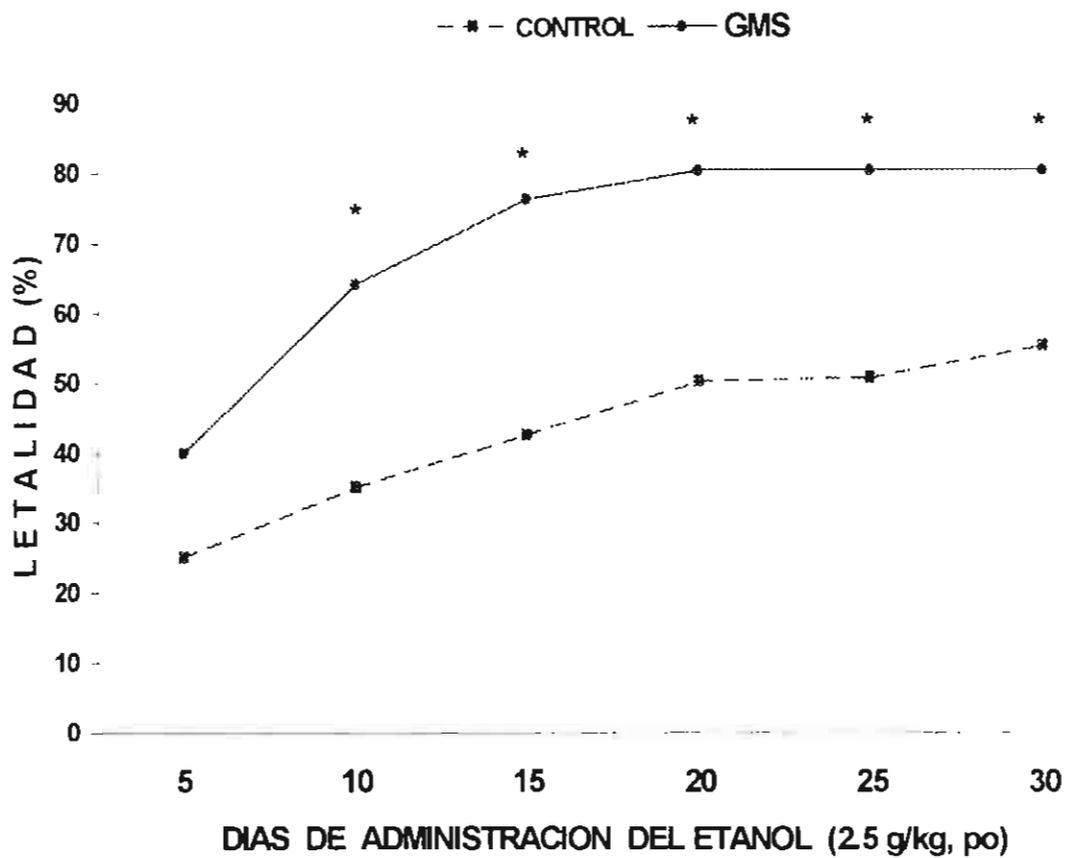


Figura 10. Influencia del tratamiento neonatal con el GMS o con solución salina sobre el efecto letal acumulado, inducido por la administración crónica (una dosis cada 24 h) del etanol, durante treinta días (n de 20 ratones por grupo). *p < 0.05

■ CONTROL □ GMS

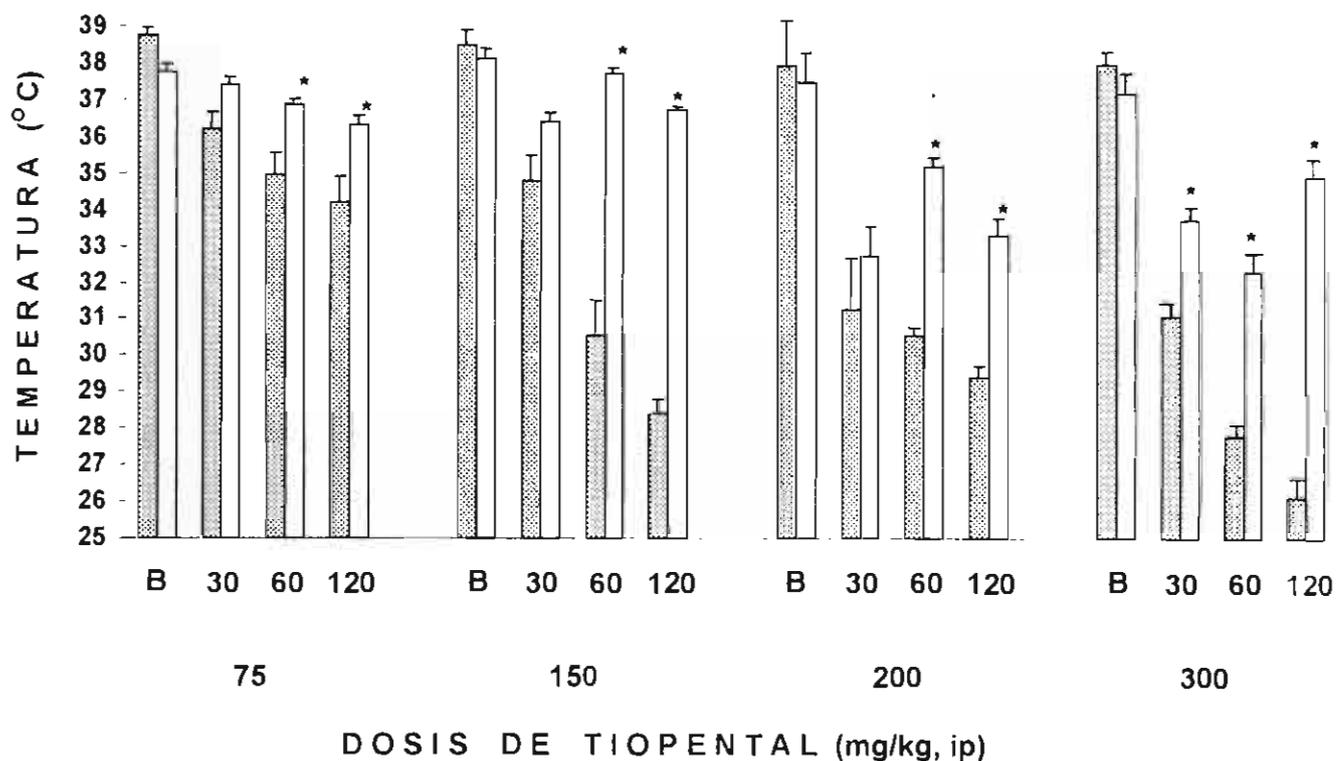


Figura 11. Influencia del tratamiento neonatal con el GMS o con solución salina, sobre la evolución temporal, durante 120 minutos, del efecto hipotérmico inducido por la administración aguda de tiopental por vía intraperitoneal, a varias dosis, en el ratón (n de 10 animales por dosis y grupo). Los resultados se expresan como el valor promedio \pm EE. * $p < 0.05$.

fueron significativamente ($p < 0.05$) menos susceptibles al efecto hipotérmico, respecto al grupo control. También se observó una tendencia a la recuperación de la temperatura rectal en el caso de los animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS y que recibieron el tiobarbitúrico, particularmente a los 120 minutos, en relación al grupo de animales control. Los cambios en la susceptibilidad al efecto hipnótico del depresor del SNC se observan en la Figura 12, los animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS, nuevamente fueron significativamente menos susceptibles ($p < 0.05$) al efecto depresor del tiopental, en relación a lo que ocurrió con el grupo control. En la Figura 13 se aprecia un desplazamiento de la curva dosis-respuesta a la derecha del grupo de animales neurointoxicados, respecto a lo que ocurrió con el grupo control. La DE_{50} hipnótica fue de 267.68 y de 90.48 mg/kg para el grupo neurointoxicado y el grupo control, respectivamente (TABLA VI).

En relación a la susceptibilidad al efecto letal agudo del tiopental, nuevamente se observó que el grupo de animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS, fue claramente menos susceptible respecto al grupo control (Figura 14). La DL_{50} para el grupo control fue de 186.39 mg/kg (TABLA VI), en tanto que la DL_{50} para el grupo tratado con el GMS no fue posible obtenerla por falta de datos, ya que con la dosis mayor del tiopental (300 mg/kg) se obtiene una letalidad de sólo el 10%.

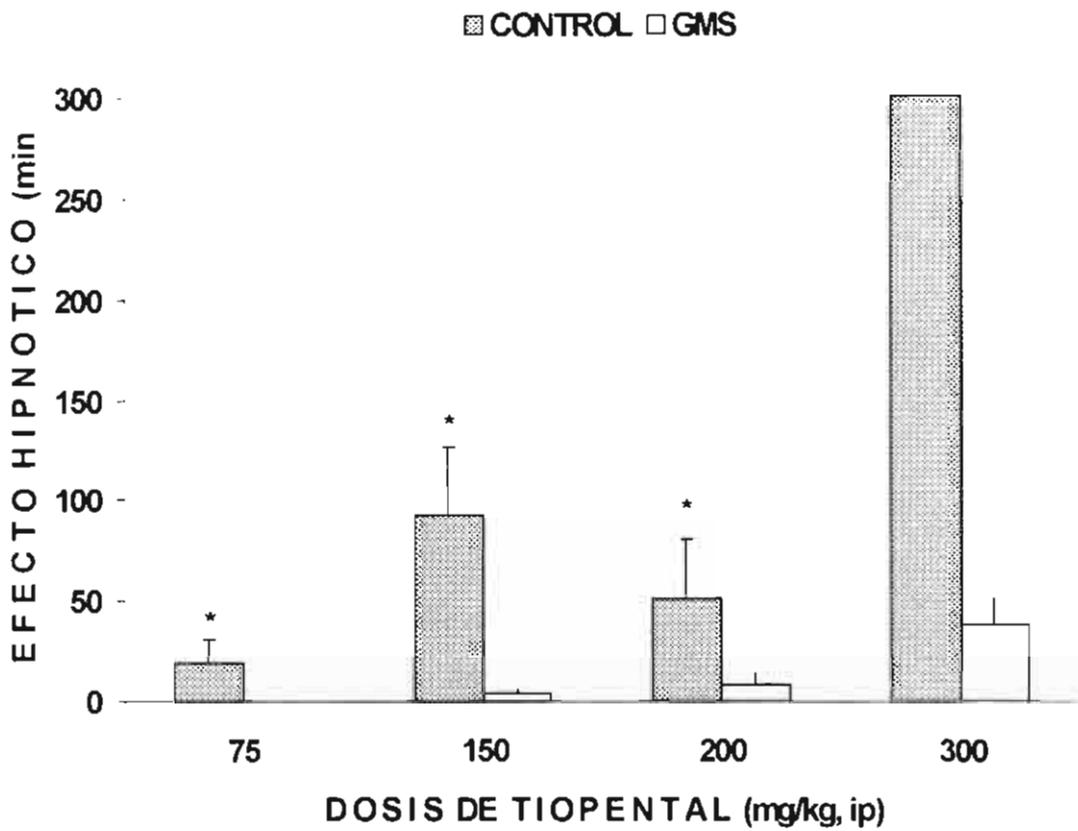


Figura 12. Curva dosis-respuesta al efecto hipnótico inducido por el tiopental en animales pretratados neonatalmente con solución salina o con GMS. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm EE de la duración del efecto hipnótico (n de 10 animales por dosis y por grupo).
*p < 0.05

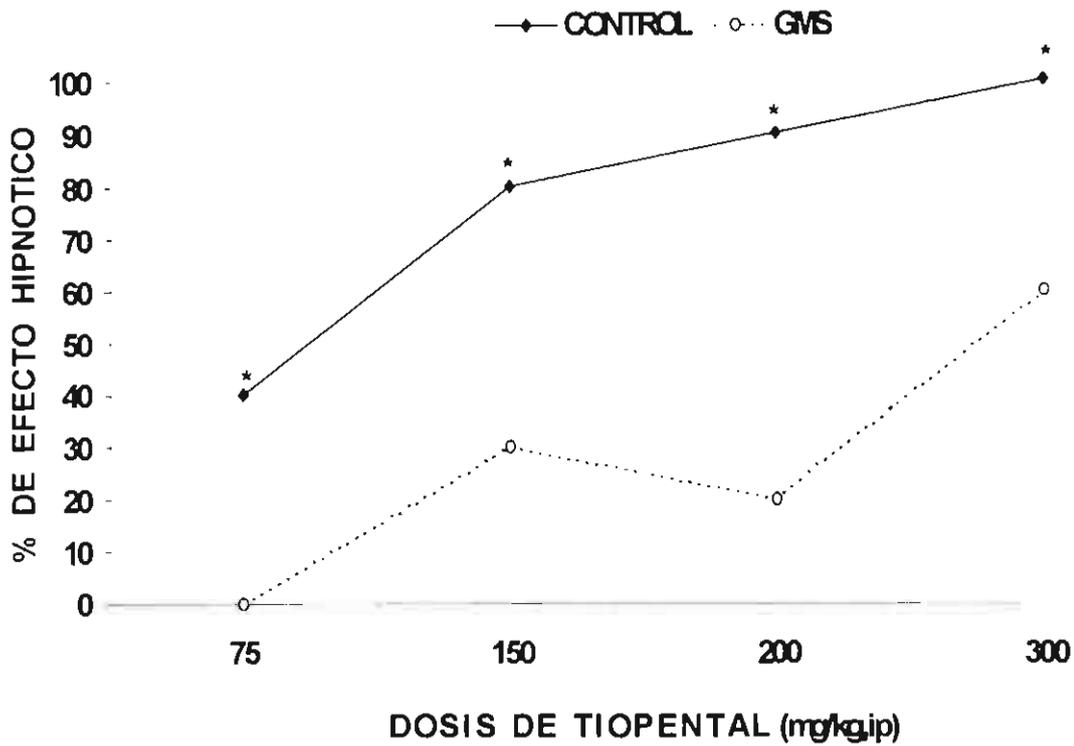


Figura 13. Curva dosis-respuesta cuantitativa al efecto hipnótico inducido por el tiopental administrado agudamente por vía intraperitoneal a ratones neurointoxicados neonatalmente con el GMS (o) y a los ratones del grupo control (♦). Los resultados se expresan como el porcentaje de animales que presentaron el efecto hipnótico (n de 10 animales por dosis y grupo). *p < 0.05.

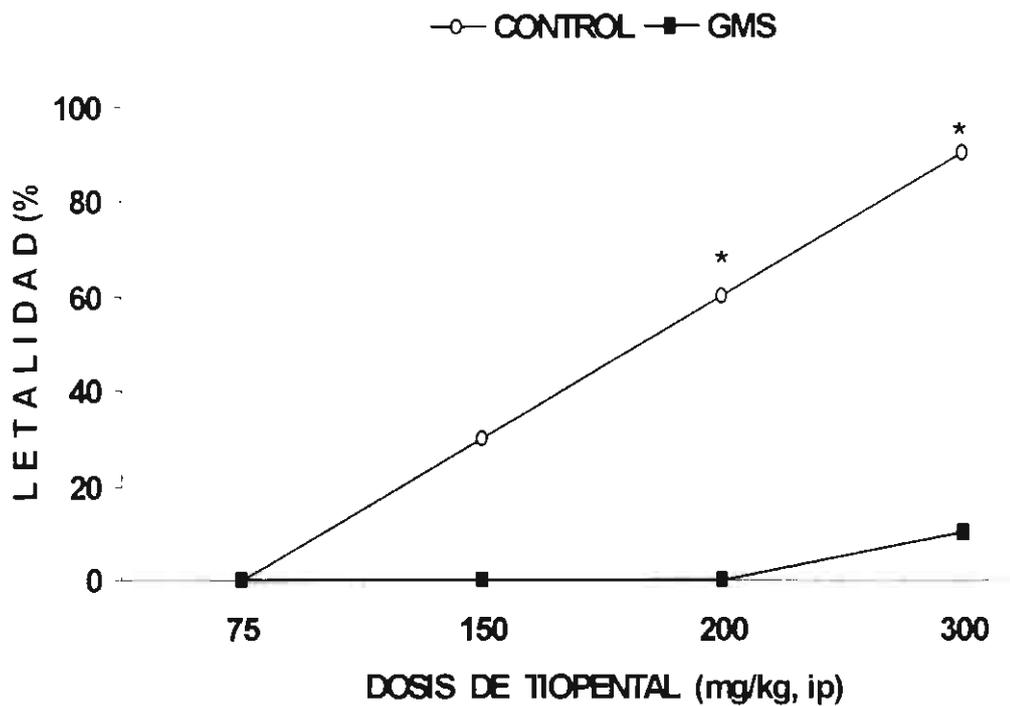


Figura 14. Curva dosis-respuesta al efecto letal inducido por el tiopental administrado por vía intraperitoneal en ratones neurointoxicados neonatalmente con el GMS o en los pretratados con solución salina. Los resultados se expresan en porcentaje de animales que murieron (n de 10 animales por dosis y grupo). * $p < 0.05$

TABLA VI. Valores de la Dosis Efectiva Cincuenta Hipnótica (DE_{50H}) y de la Dosis Letal Cincuenta (DL₅₀) del tiopental administrado por vía intraperitoneal a los ratones del grupo control y a los animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS. Entre paréntesis se muestran los límites de confianza al 95% (Litchfield & Wilcoxon, 1949).

GRUPOS	DE _{50H} (mg/kg, ip)	DL ₅₀ (mg/kg, ip)
CONTROL	90.48 (64.46-126.99)	186.39(150.22-231.27)
GMS	267.68 (194.47-368.45)	> 300

Los resultados del estudio de susceptibilidad a la administración crónica (30 días) del tiopental, por vía oral a una dosis de 100 mg/kg, reflejan diferencias significativas entre los animales neurointoxicados y los animales del grupo control para las diferentes variables estudiadas. En la Figura 15 se observa que, en términos generales, los animales neurointoxicados fueron significativamente ($p < 0.05$) menos vulnerables al efecto hipotérmico del tiopental, aún cuando en algunos tiempos no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a los animales del grupo control. El análisis de la evolución temporal del peso corporal durante los treinta días de tratamiento con el tiopental, muestra una drástica caída del peso corporal para el grupo de animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS (Figura 16), en tanto que el peso corporal del grupo control no presentó cambios importantes a lo largo del tratamiento crónico con el barbitúrico. Se puede destacar que los animales tratados neonatalmente con el GMS y que sobrevivieron a los 30 días de tratamiento con el tiopental, pesaban en

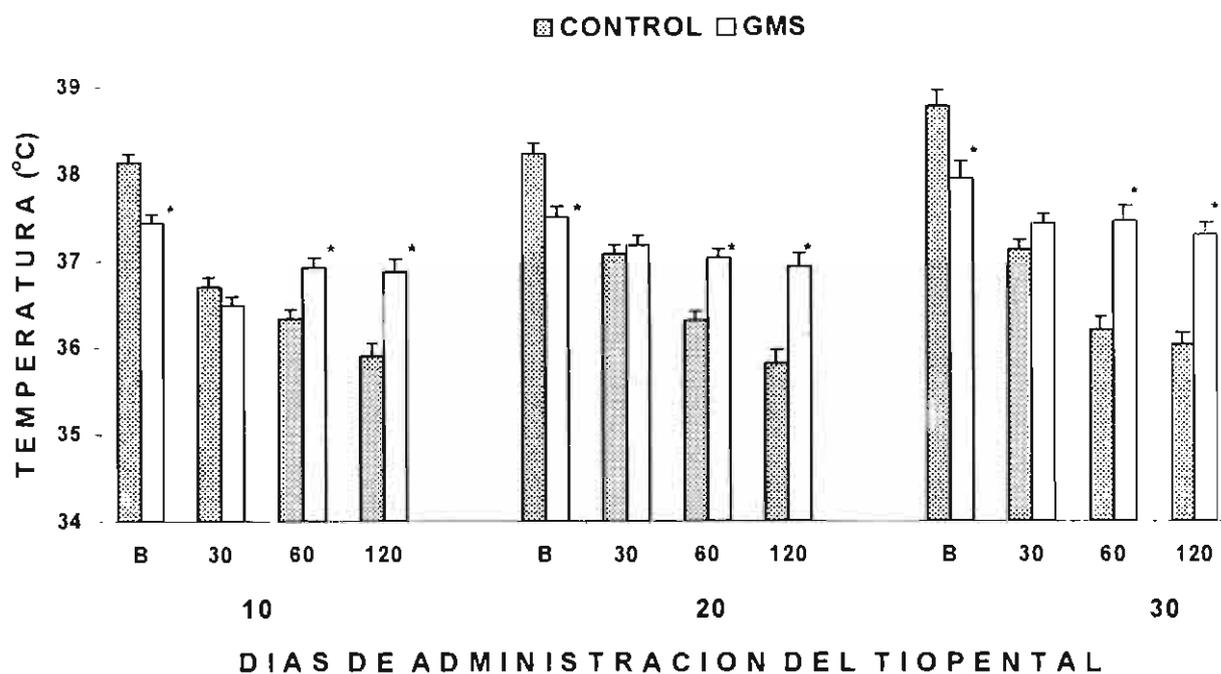


Figura 15. Influencia del tratamiento neonatal con el GMS o con solución salina, sobre la evolución temporal, durante 120 minutos, del efecto hipotérmico inducido por la administración crónica (una dosis cada 24 h) de tiopental (100 mg/kg po) durante 30 días. Los resultados se expresan como el promedio \pm ET de la temperatura rectal acumulada para 10, 20 y 30 días de tratamiento (n de 15 animales por grupo). *p < 0.05.

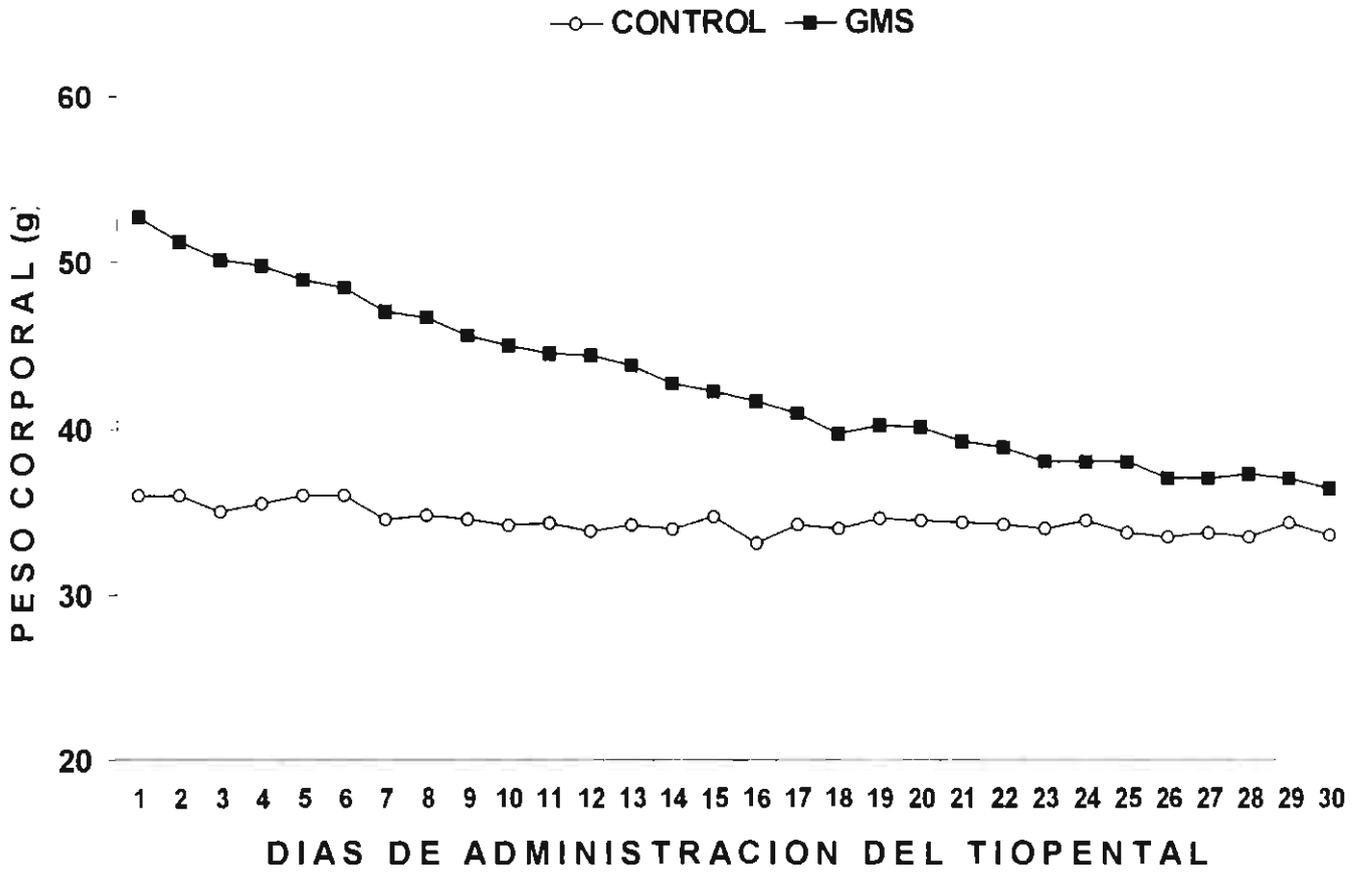


Figura 16. Influencia de la neurotoxicidad provocada neonatalmente con el GMS o del tratamiento con solución salina en el ratón, sobre las modificaciones en el peso corporal provocadas por la administración crónica (una dosis cada 24 h) del tiopental (100 mg/kg, po) durante 30 días (n de 15 animales por grupo).

promedio 36.29 ± 5.91 g, lo que significa una pérdida del 31% del peso corporal inicial (52.65 ± 7.01 g). El peso corporal promedio de los animales control al inicio del tratamiento crónico con el tiopental fue de 35.95 ± 3.23 g y de 33.5 ± 2.95 al final del tratamiento, diferencias no significativas ($p > 0.05$). En relación a la letalidad acumulada durante los 30 días de tratamiento con el depresor del SNC, se aprecia que los ratones neurointoxicados con el GMS fueron significativamente ($p < 0.05$) menos susceptibles al efecto letal del tiobarbitúrico, respecto a la susceptibilidad que mostraron los animales del grupo control (Figura 17). De hecho, no murió ningún roedor neurointoxicado durante los 30 días de tratamiento con el tiobarbitúrico.

Por otra parte, los resultados de susceptibilidad al efecto hipotérmico del fenobarbital bajo condiciones de administración aguda, en general, no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$), con excepción de la dosis mayor (200 mg/kg) en que los animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS fueron significativamente ($p < 0.05$) menos susceptibles, respecto al grupo control (Figura 18). En relación a la duración del efecto hipnótico del oxibarbitúrico, no fue posible establecerla ya que con las dosis de 50 y 100 mg/kg, no se induce el efecto, mientras que con las dosis mayores (200 y 300 mg/kg) ambos grupo de animales (controles y neurointoxicados) presentan el 100% de efecto hipnótico; efecto depresor del SNC que progresa hasta el 100% de letalidad en los dos grupos. La DE_{50} hipnótica fue de 141.41 mg/kg para ambos grupos, calculada por el método Log-probit (Miller & Tainter, 1944); de igual manera, la susceptibilidad al efecto letal agudo del fenobarbital fue similar: la DL_{50} fue de 134.24 y 146.40 mg/kg, para el grupo control y el grupo neurointoxicado

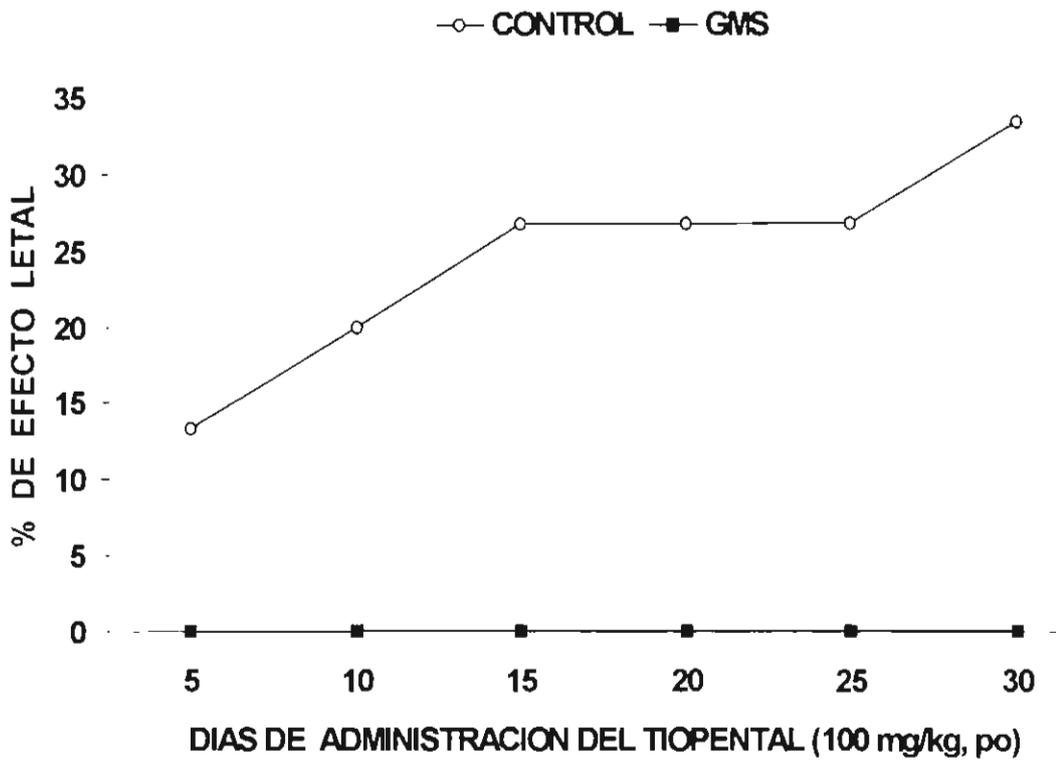


Figura 17. Influencia del tratamiento neonatal con GMS o con solución salina sobre el efecto letal acumulado, inducido por la administración crónica de tiopental durante 30 días (n de 15 animales por grupo).

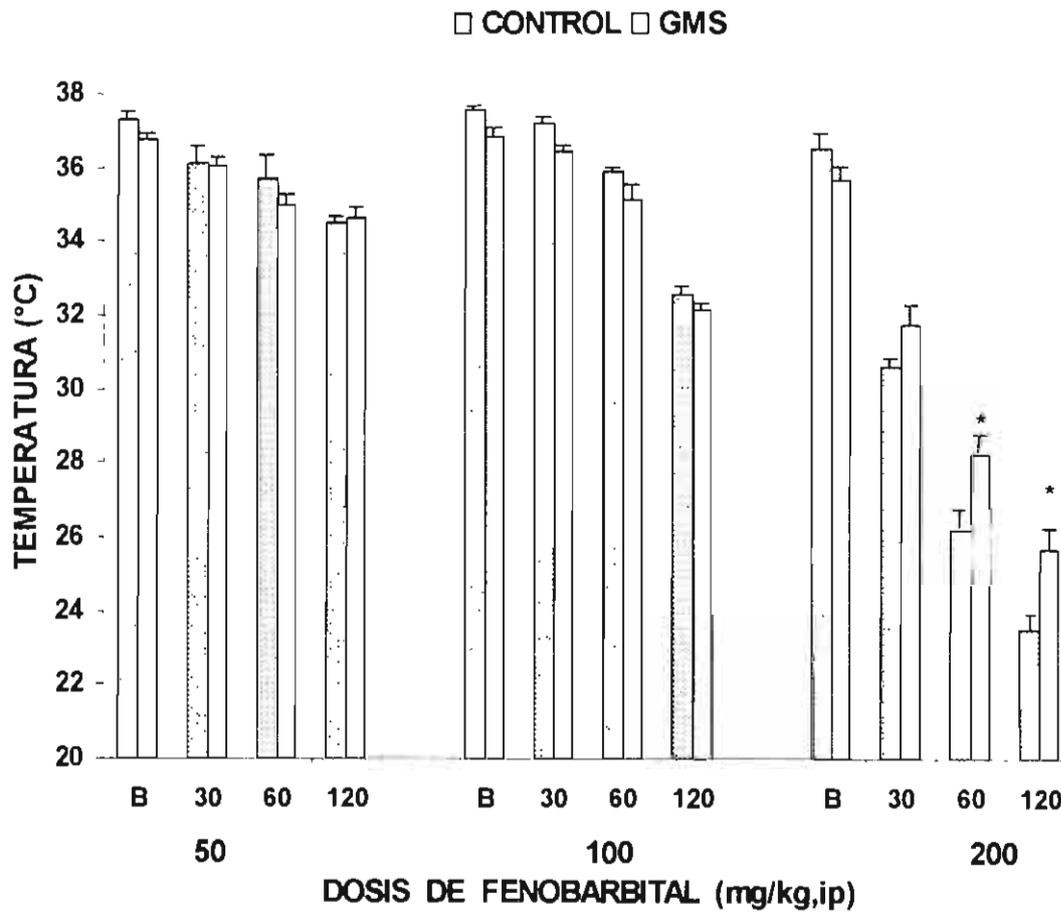


Figura 18. Influencia del tratamiento neonatal con el GMS o con solución salina, sobre la evolución temporal, durante 120 minutos, del efecto hipotérmico inducido por la administración aguda del fenobarbital, a varias dosis en el ratón (n de 10 animales por dosis y grupo). Los resultados como el valor promedio de la temperatura rectal \pm EE. *p < 0.05.

respectivamente (TABLA VII).

TABLA VII. Valores de la Dosis Efectiva Cincuenta Hipnótica (DE_{50H}) y de la Dosis Letal Cincuenta (DL_{50}) del fenobarbital administrado por vía intraperitoneal a los ratones del grupo control y a los animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS. La DE_{50H} y la DL_{50} se calcularon por el método gráfico Log-probits (Miller & Tainter, 1944).

GRUPOS	DE_{50H} (mg/kg, ip)	DL_{50} (mg/kg, ip)
CONTROL	141.41	134.46
GMS	141.41	146.40

Los resultados del estudio de susceptibilidad a la administración crónica durante 30 días del fenobarbital, por vía oral a una dosis de 100 mg/kg, mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los animales neurointoxicados y los animales del grupo control, para algunas de las variables estudiadas. En la Figura 19 se observa que la susceptibilidad al efecto hipotérmico fue similar en ambos grupos de animales y que sólo hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) a los diez días de administración del barbitúrico, particularmente a los 30 y 120 min. La evolución temporal del peso corporal durante los treinta días de tratamiento con el oxibarbitúrico, muestra una franca caída del peso corporal para el grupo de animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS (Figura 20), en tanto que el peso corporal del grupo control presentó fluctuaciones discretas con tendencias al incremento más que a la pérdida de peso corporal, particularmente en los últimos días de tratamiento. El promedio del peso corporal al inicio del tratamiento para el grupo GMS fue de 43.78 ± 1.01 g y el promedio del peso

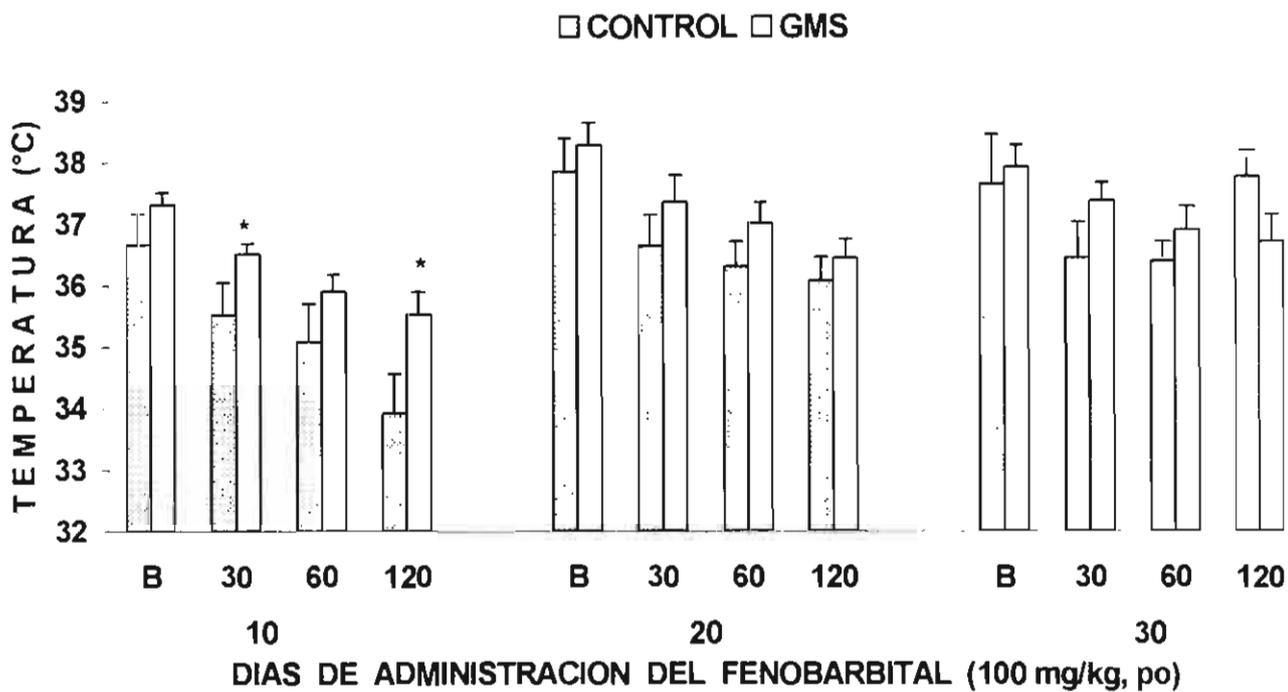


Figura 19. Influencia del tratamiento neonatal con GMS o con solución salina, sobre la evolución temporal, durante 120 minutos, del efecto hipotérmico inducido por la administración crónica de fenobarbital (100 mg/kg po) durante 30 días. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm EE de la temperatura rectal acumulada para 10, 20 y 30 días de administración del fenobarbital (n de 13 y 10 ratones por grupo). *p < 0.05.

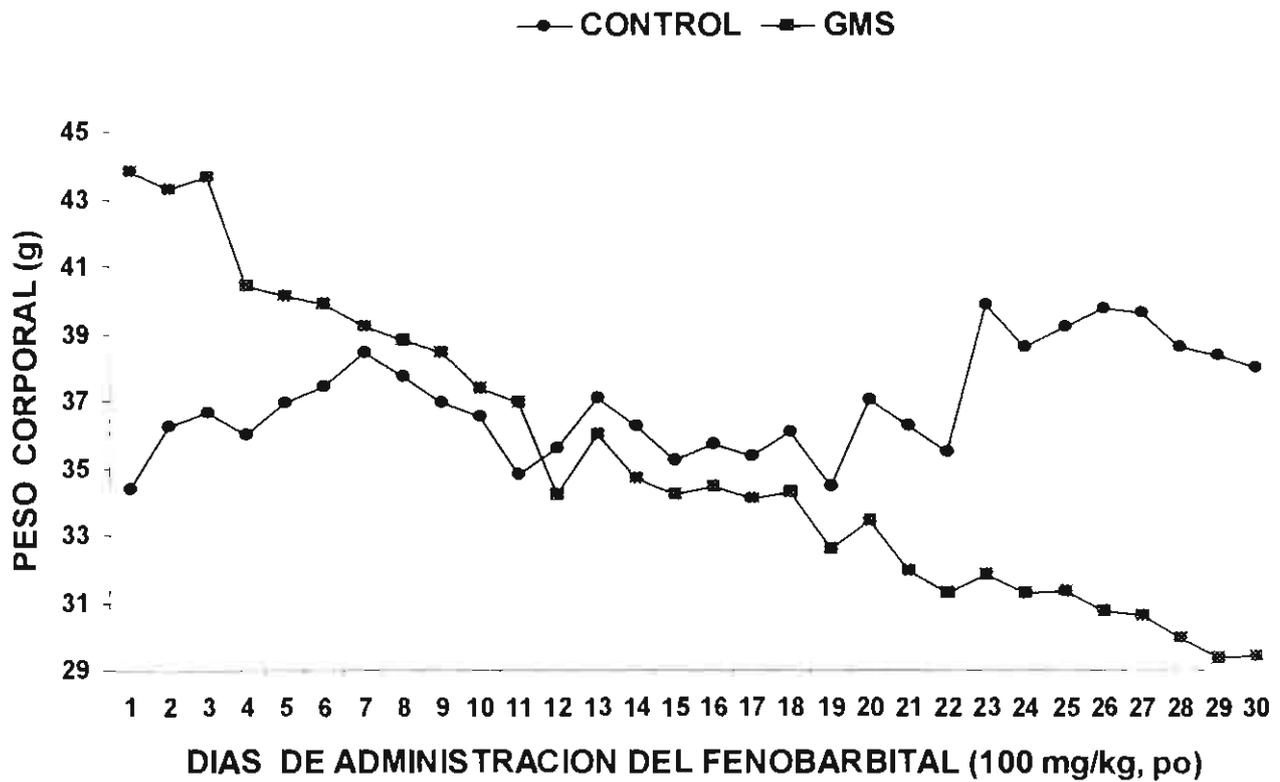


Figura 20. Influencia de la neurotoxicidad inducida neonatalmente con el GMS o del tratamiento con solución salina sobre las modificaciones del peso corporal provocadas por la administración crónica del fenobarbital (100 mg/kg po), durante 30 días (n de 13 y 10 ratones por grupo).

corporal de los que sobrevivieron a los 30 días de tratamiento con el fenobarbital. fue de 29.47 ± 1.88 g, lo que representa una pérdida del 32.68 % del peso corporal inicial. diferencias altamente significativas ($p < 0.001$). El peso corporal promedio de los animales control al inicio del tratamiento crónico con el barbitúrico fue de 34.36 ± 2.20 g y el promedio del peso corporal de los dos sobrevivientes a los 30 días de tratamiento fue de 37.97 ± 1.34 g, diferencias no significativas ($p > 0.05$). La letalidad acumulada durante los 30 días de tratamiento con el depresor del SNC se aprecia en la Figura 21. Los ratones neurointoxicados con el GMS fueron significativamente ($p < 0.05$) menos susceptibles al efecto letal del fenobarbital, respecto a la susceptibilidad que mostraron los animales del grupo control.

En cuanto a los resultados obtenidos sobre la susceptibilidad al efecto hipotérmico de la administración aguda del diazepam administrado a varios niveles de dosis (12.5, 25 y 50 mg/kg), como se muestra en la Figura 22, los roedores neurointoxicados con el GMS. en general, fueron más susceptibles ($p < 0.05$) con respecto a los animales del grupo control, particularmente con la dosis intermedia (25 mg/kg) y la dosis alta (50 mg/kg). En las Figuras 23 y 24 se muestran las curvas dosis-respuesta que presentaron los ratones neurointoxicados o los controles al efecto hipnótico, expresado como la duración (Figura 23) y en términos cuantales del efecto hipnótico (Figura 24) a la administración aguda del diazepam. Se puede apreciar que los animales neurointoxicados fueron significativamente ($p < 0.05$) más susceptibles al efecto hipnótico, así como al efecto letal de la benzodiazepina, en relación al grupo control (Figura 25). El cálculo por el método de Miller y Tainter de la DE_{50} hipnótica fue de

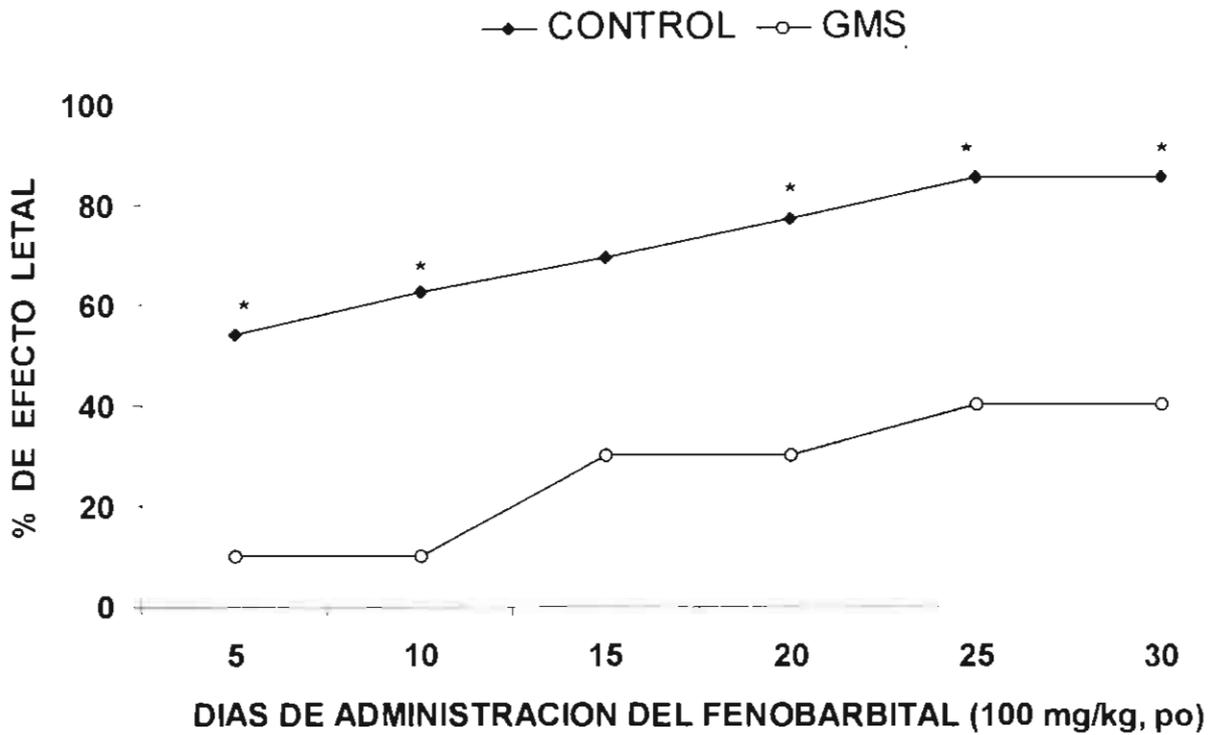


Figura 21. Influencia del tratamiento neonatal con el GMS o con solución salina sobre el efecto letal acumulado, inducido por la administración crónica de fenobarbital (100 mg/kg, po), durante 30 días, una dosis administrada cada 24 horas (n de 13 controles y de 10 animales pretratados con GMS). *p < 0.05.

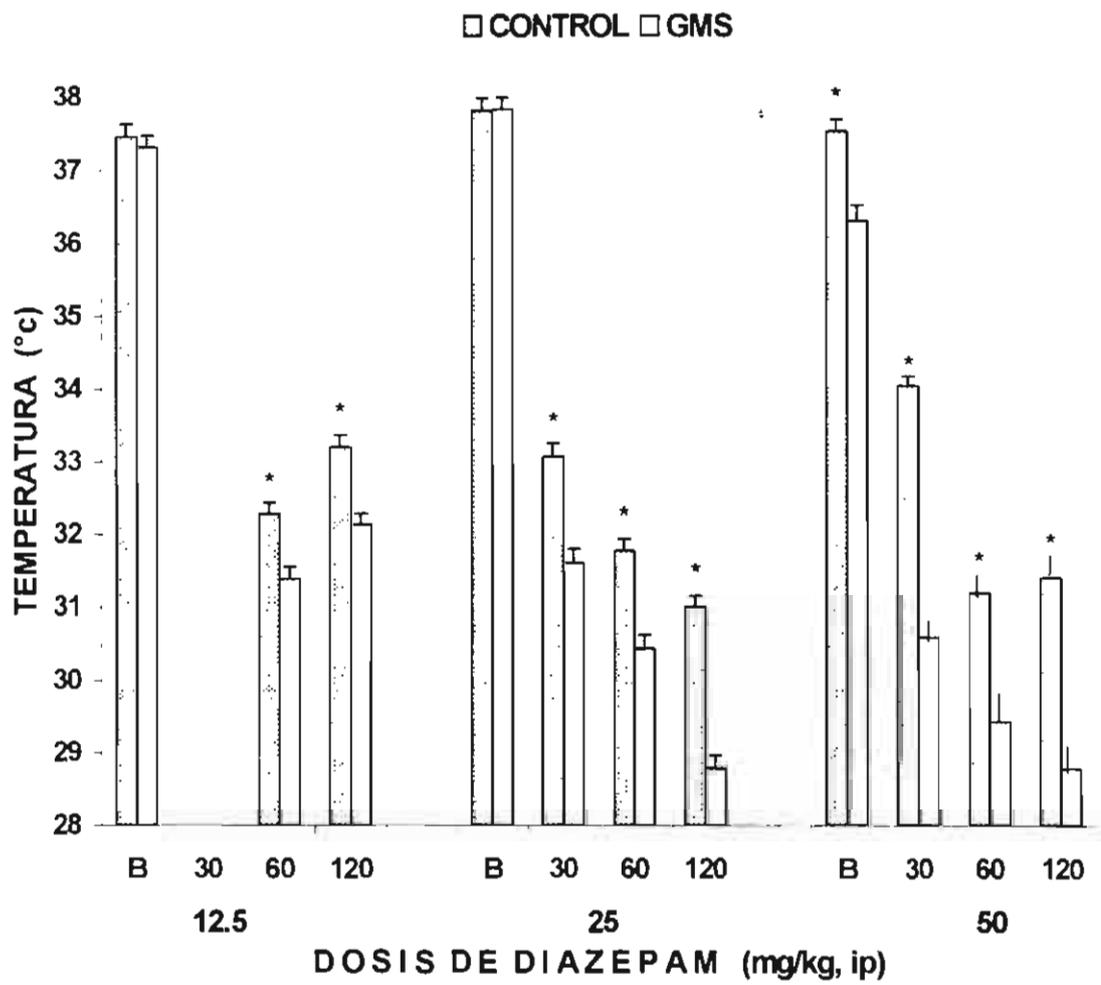


Figura 22. Influencia del tratamiento neonatal con GMS o con solución salina, sobre la evolución temporal, durante 120 minutos, del efecto hipotérmico inducido por la administración aguda del diazepam por vía intraperitoneal, a varias dosis (n de 10 ratones por dosis y por grupo). Los resultados se expresan como el valor promedio de la temperatura rectal \pm EE para una n de 10 ratones por dosis y por grupo. *p < 0.05.

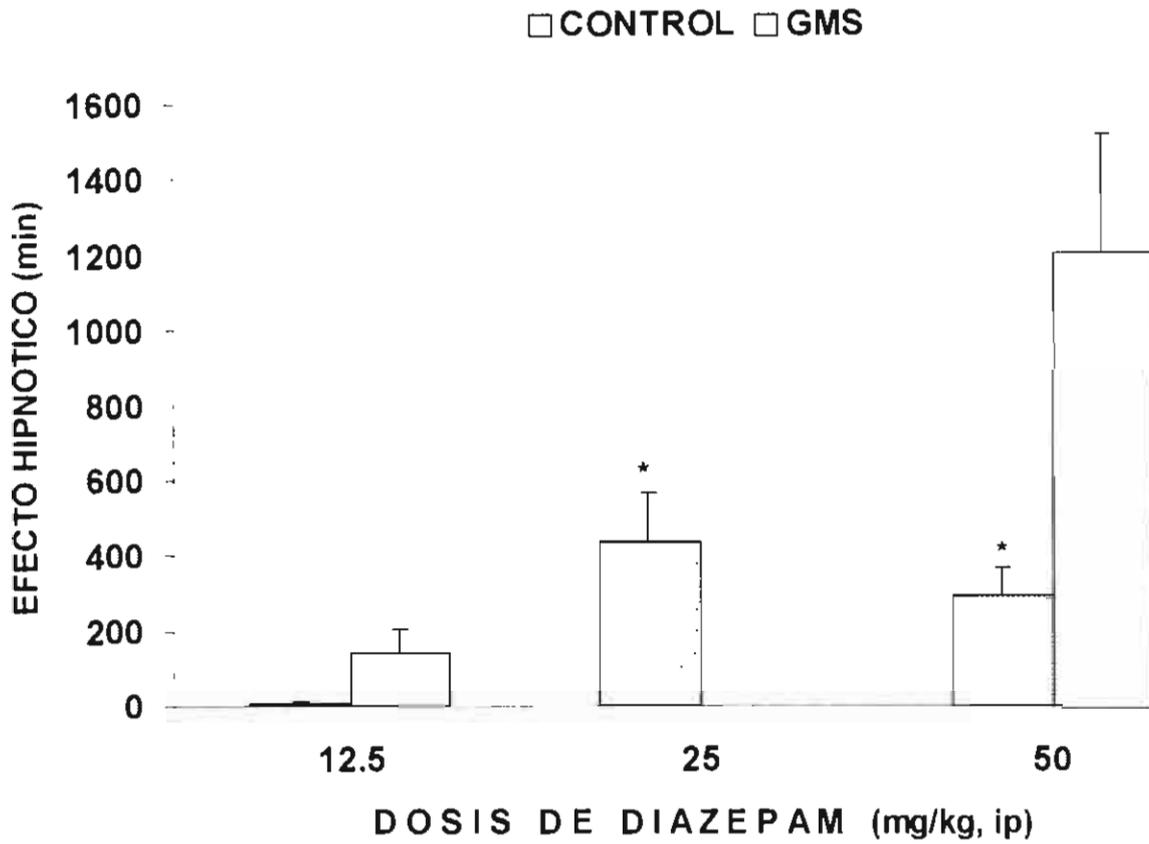


Figura 23. Curva dosis-respuesta al efecto hipnótico inducido por el diazepam en los ratones neurointoxicados neonatalmente con el GMS y en los animales del grupo control. Los resultados se expresan como el promedio de la duración en minutos del efecto hipnótico \pm EE (n de 7 a 10 ratones por dosis y grupo). *p < 0.05.

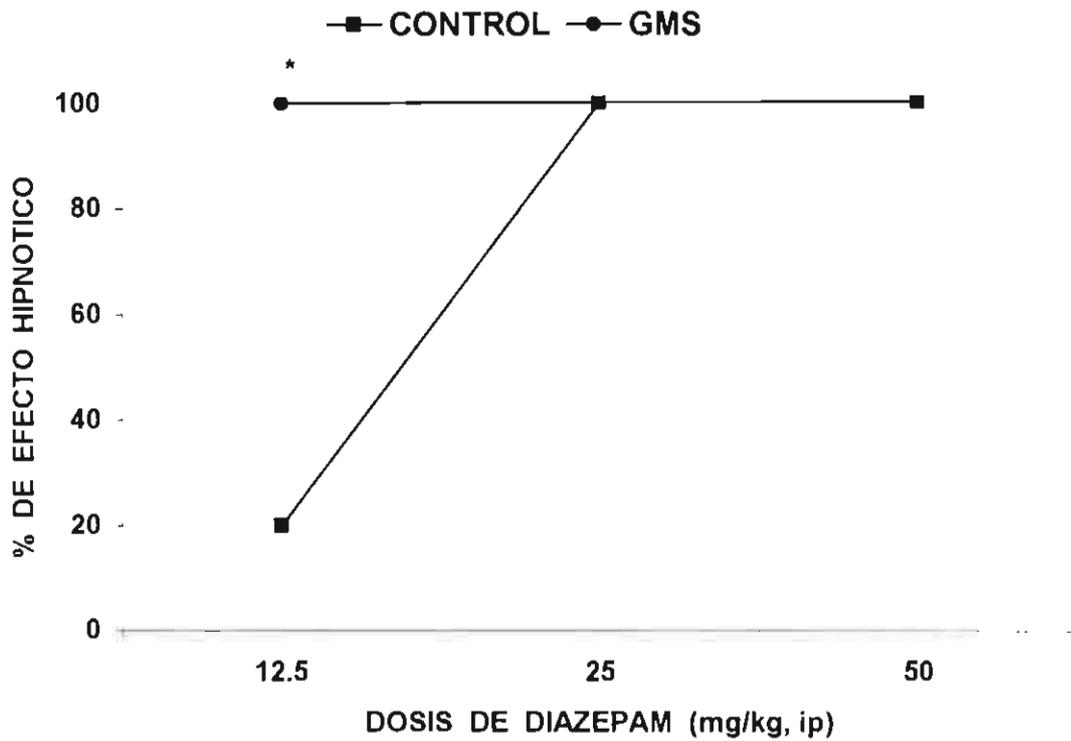


Figura 24. Curva dosis-respuesta al efecto hipnótico inducido por el diazepam administrado agudamente por vía intraperitoneal a ratones neurointoxicados neonatalmente con el GMS y a los ratones tratados neonatalmente con solución salina. Los resultados se expresan como el porcentaje de animales que presentaron el efecto hipnótico con la dosis correspondiente del diazepam (n de 10 animales por dosis y grupo). *p < 0.05.

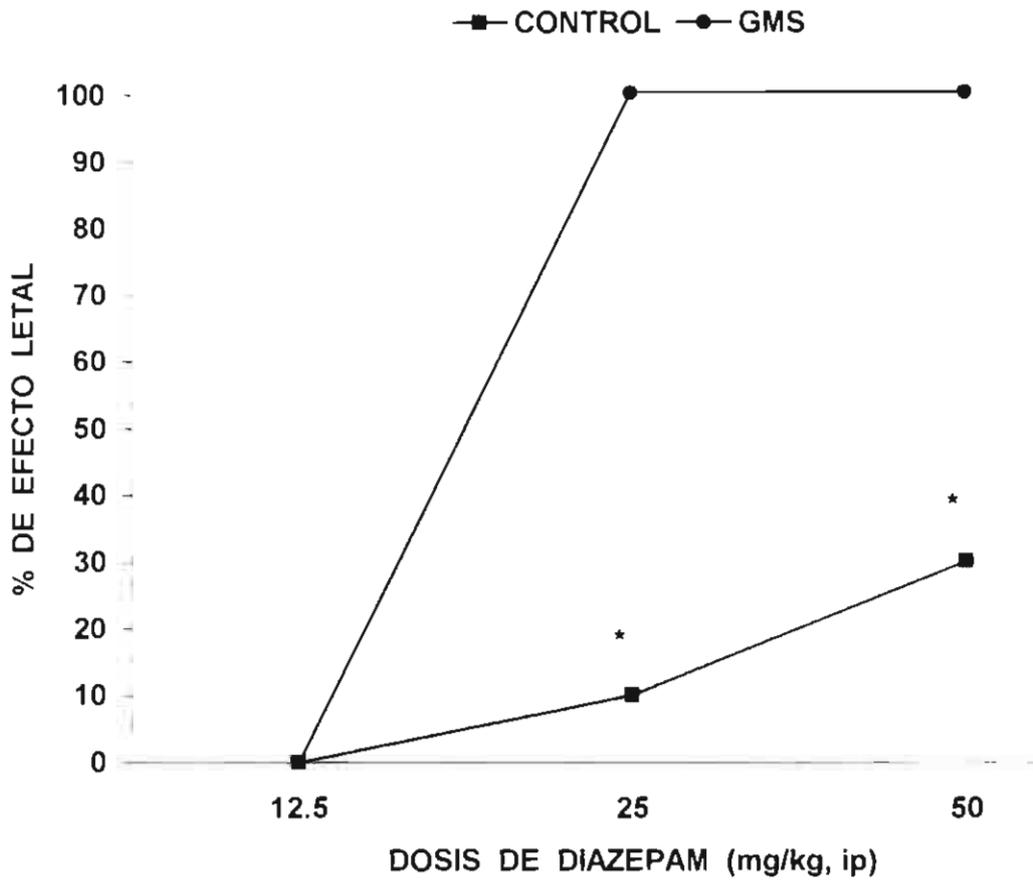


Figura 25. Curva dosis-respuesta al efecto letal inducido por el diazepam administrado por vía intraperitoneal en ratones neurointoxicados neonatalmente con el GMS o en los pretratados con solución salina. Los resultados se expresan en porcentaje de animales que murieron con la dosis correspondiente de diazepam (n de 10 animales por dosis y grupo). *p < 0.05.

15.60 y de 1.39 mg/kg, para el grupo control y el grupo neurointoxicado con el GMS, respectivamente (TABLA VIII). También se observó que la DL₅₀ de la benzodiazepina fue de 17.67 mg/kg para el grupo de animales neurointoxicados y mayor de 50 mg/kg para el grupo control (TABLA VIII).

TABLA VIII. Valores de la Dosis Efectiva Cincuenta Hipnótica (DE_{50H}) y de la Dosis Letal Cincuenta (DL₅₀) del diazepam administrado por vía intraperitoneal a los ratones del grupo control y a los animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS. La DE_{50H} y la DL₅₀, se calcularon por el método gráfico Log-probits (Miller & Tainter, 1944).

GRUPOS	DE _{50H} (mg/kg, ip)	DL ₅₀ (mg/kg, ip)
CONTROL	15.60	> 50
GMS	1.39	17.67

El análisis cuantitativo de los resultados del estudio de susceptibilidad a la administración crónica (30 días) del diazepam, por vía oral a una dosis de 12.5 mg/kg, reflejan diferencias significativas entre los animales neurointoxicados y los animales del grupo control, para las diferentes variables estudiadas. En la Figura 26 se observa que, en términos generales, los animales neurointoxicados fueron significativamente ($p < 0.05$) más vulnerables al efecto hipotérmico del diazepam, en relación a los animales del grupo control. El análisis de la evolución temporal del peso corporal durante los treinta días de tratamiento con el diazepam, muestra una caída del peso corporal estadísticamente significativa, para el grupo de animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS (Figura 27), en tanto que el peso corporal del grupo control

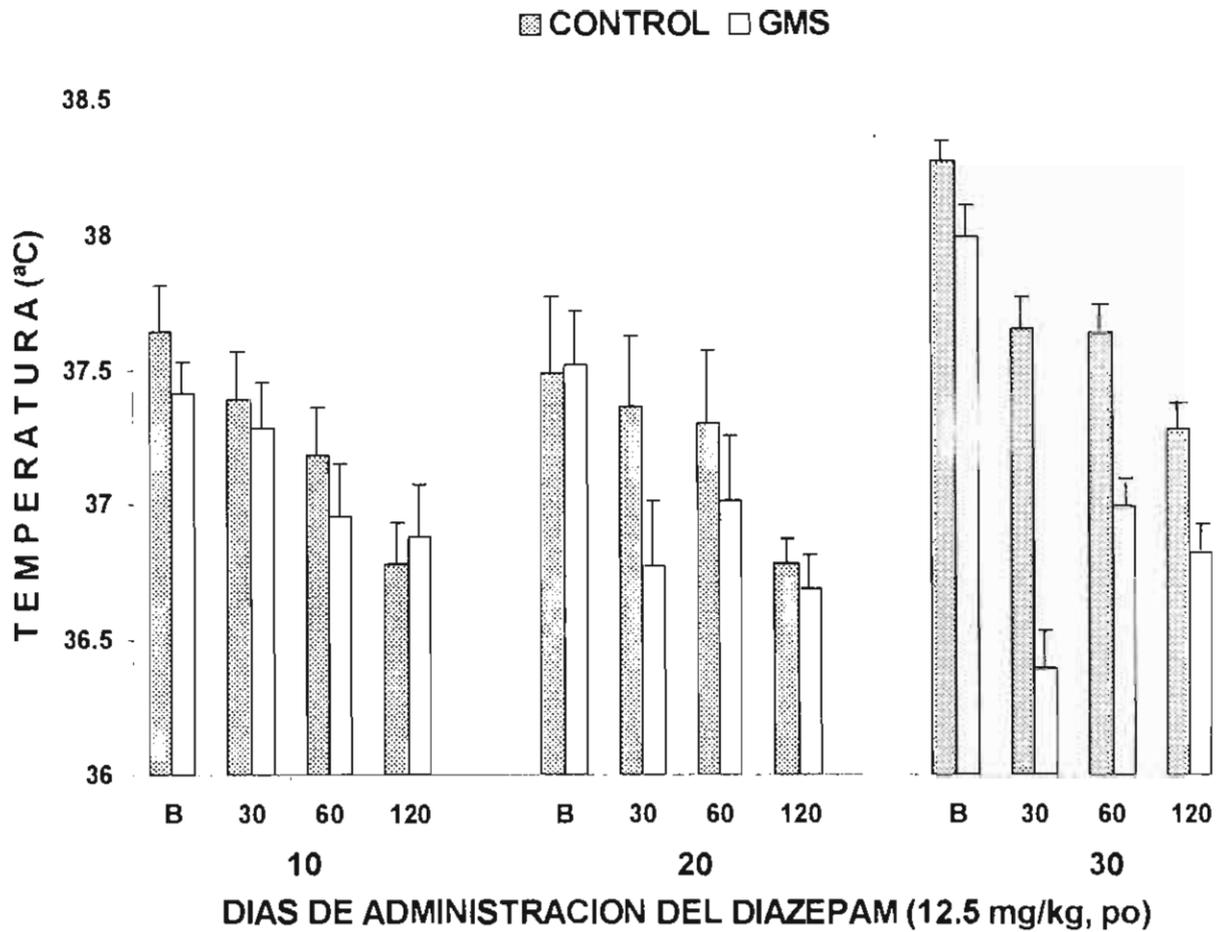


Figura 26. Influencia del tratamiento neonatal con GMS o con solución salina, sobre la evolución temporal, durante 120 minutos, del efecto hipotérmico inducido por la administración crónica (una dosis cada 24 h) de diazepam (12.5 mg/kg, po) durante 30 días. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm EE de la temperatura rectal acumulada para 10, 20 y 30 días de administración del diazepam (n de 10 ratones por grupo). *p < 0.05.

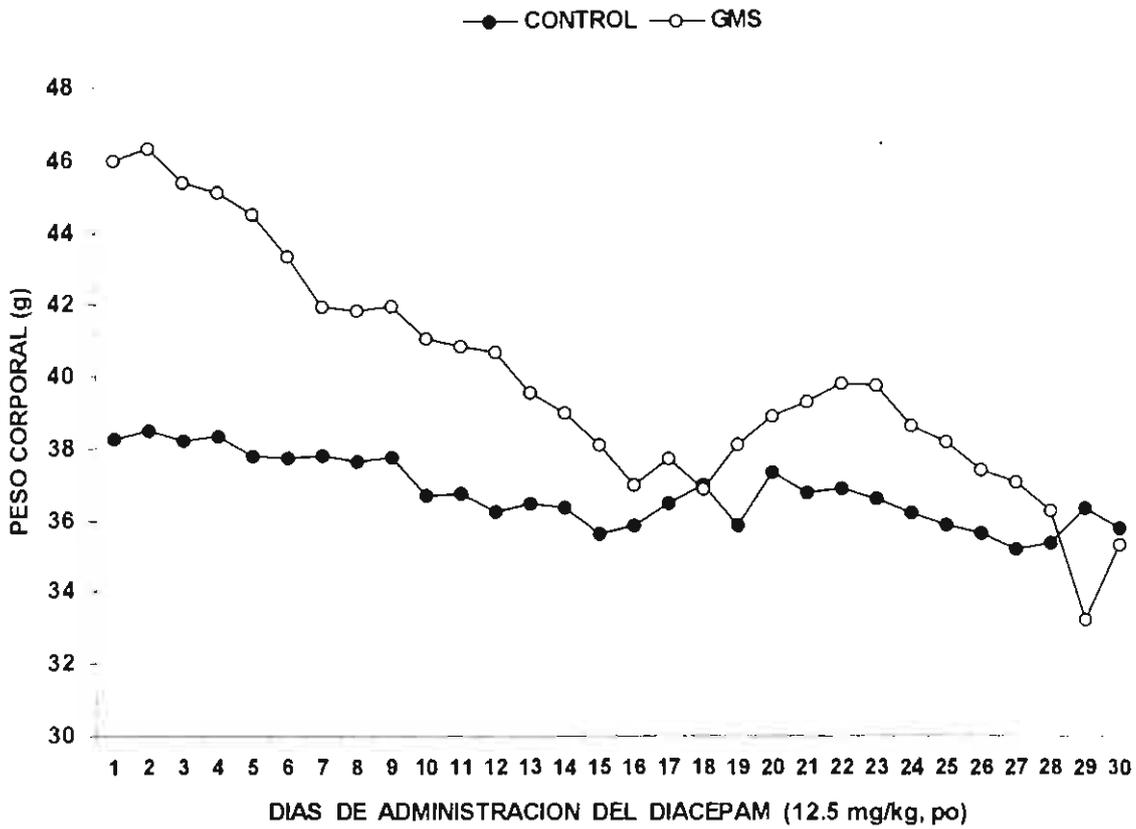


Figura 27. Influencia de la neurotoxicidad inducida neonatalmente con el GMS o del tratamiento con solución salina sobre las modificaciones del peso corporal provocadas por la administración crónica (una dosis cada 24 hs) del diazepam (12.5 mg/kg po), durante 30 días (n de 10 ratones hembra por grupo).

no presentó cambios importantes a lo largo del tratamiento crónico con la benzodiazepina. Se puede destacar que los animales tratados neonatalmente con el GMS y que sobrevivieron a los 30 días de tratamiento con el diazepam, pesaban en promedio 35.23 ± 3.44 g, lo que representa una pérdida del 24.43% respecto al peso corporal inicial (46.62 ± 2.70 g). El peso corporal promedio de los animales control al inicio del tratamiento crónico con el diazepam fue de 38.62 ± 1.32 g y de 35.70 ± 1.05 al final del tratamiento, lo que indica una pérdida del 7.56 % del peso corporal inicial (Figura 27). Respecto a la letalidad acumulada durante los 30 días de tratamiento con el agonista GABAérgico, se encontró que en general, los animales neurointoxicados con el GMS fueron más susceptibles al efecto letal del diazepam, aún cuando no hubo diferencias significativas, excepto a los 30 días, respecto a la susceptibilidad que mostraron los animales del grupo control (Figura 28).

La susceptibilidad al efecto letal inducido por la administración intracerebral aguda del GABA, se muestra en la Figura 29. Los resultados indican que los animales neurointoxicados neonatalmente con el aminoácido excitatorio son más proclives al efecto depresor del neurotransmisor inhibitorio, específicamente con la dosis de 250 y 300 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$, sin embargo, con la dosis alta (400 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) se obtiene una letalidad similar en ambos grupos.

Por otra parte, como se puede apreciar en la Figura 30, los resultados obtenidos sobre la curva de la evolución temporal durante 120 min de las concentraciones sanguíneas del etanol, determinadas por cromatografía de gases, en los animales del grupo control y en los neurointoxicados con el GMS y que recibieron 2.5 g/kg por vía oral, no

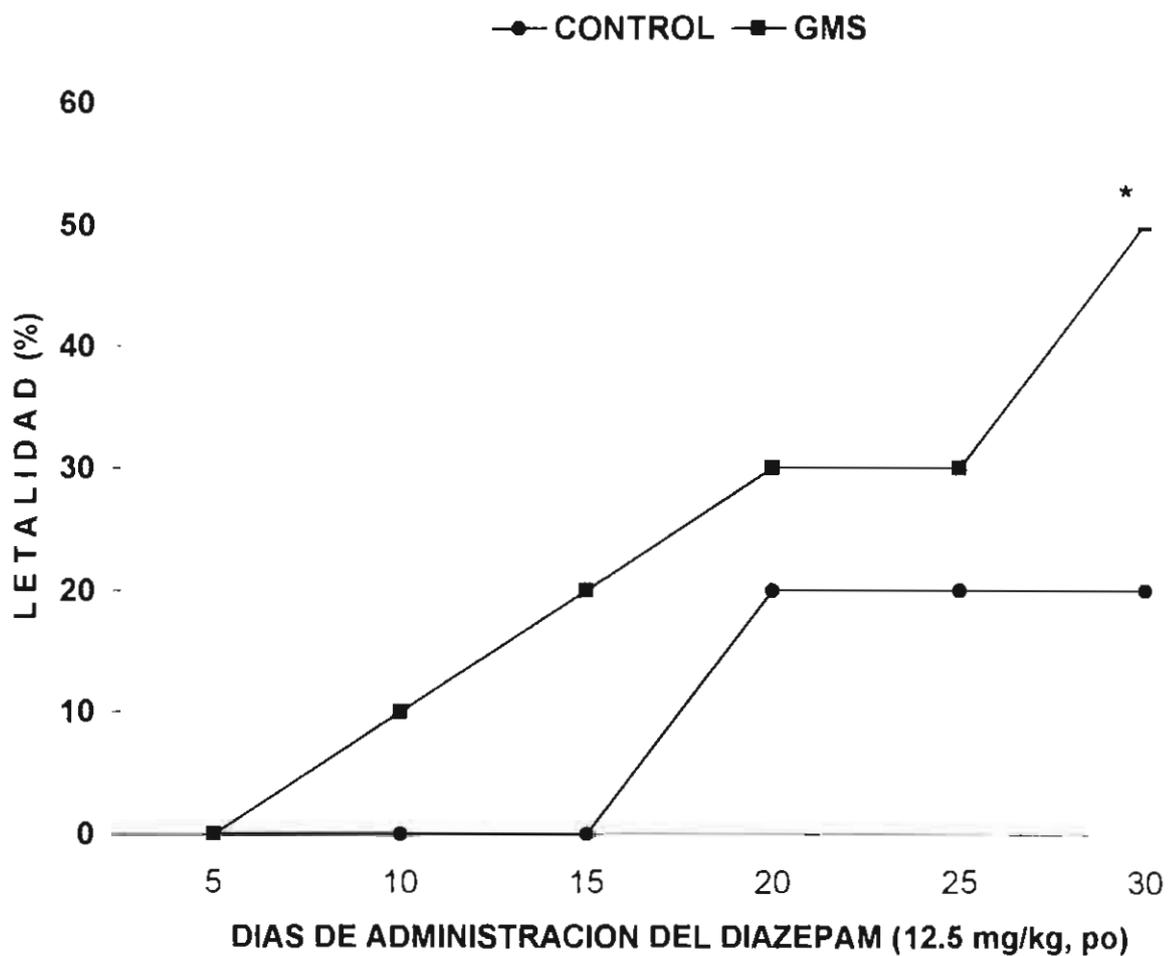


Figura 28. Influencia del tratamiento neonatal con el GMS o con solución salina sobre el efecto letal acumulado, inducido por la administración crónica del diazepam (12.5 mg/kg po) durante 30 días (n de 10 ratones por grupo). * $p < 0.05$

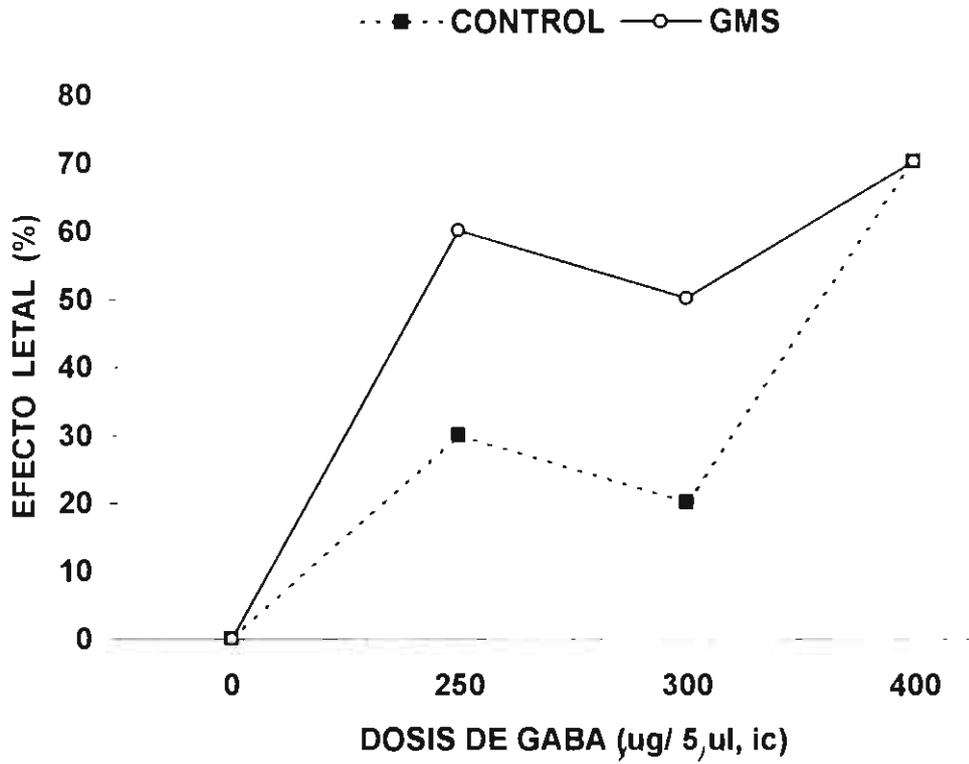


Figura 29. Curva dosis-respuesta al efecto letal inducido por el GABA administrado por vía intracerebral. Los resultados se expresan en porcentaje de animales que murieron con la dosis correspondiente del GABA (n de 10 ratones macho por dosis y grupo. *p < 0.05).

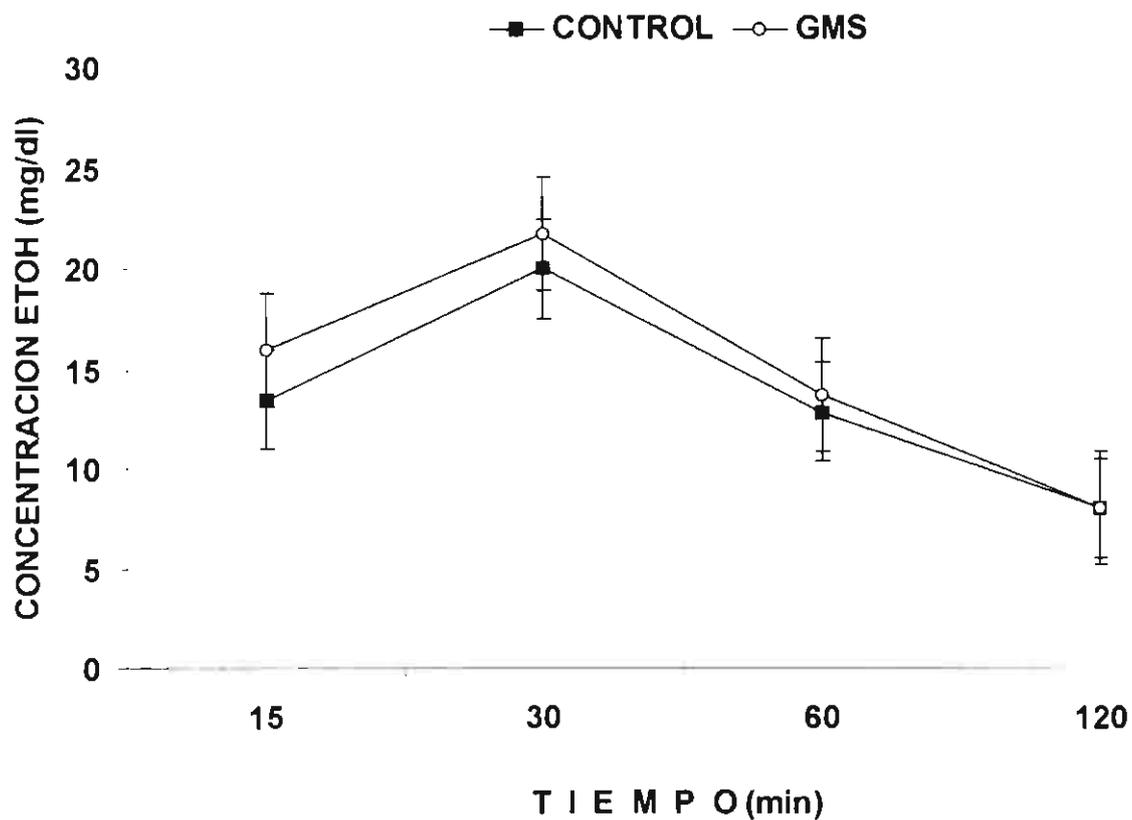


Figura 30. Evolución temporal de las concentraciones sanguíneas del etanol (2.5 g/kg) administrado por vía oral a un grupo de ratones neurointoxicados neonatalmente con el GMS y al grupo control. Los resultados se expresan como el valor promedio en mg/dl \pm EE (n de cinco ratones por grupo).

mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). El cálculo de los parámetros farmacocinéticos a partir de las curvas de evolución temporal de las concentraciones sanguíneas tales como: Concentración máxima (C_{max}), Tiempo de concentración máxima (T_{max}), Biodisponibilidad (F), Constante de eliminación (K_e), Tiempo de vida media ($T_{1/2}$) y Depuración (Cl_o), no mostraron diferencias significativas.

Los resultados obtenidos sobre las concentraciones cerebrales de GABA, determinados de acuerdo a Zecca y Zambotti, por HPLC se muestran en la Figura 31, se aprecia que los animales neurointoxicados con el GMS tienen una concentración significativamente menor ($p < 0.05$) de GABA ($233 \pm 32.81 \mu\text{g/g}$ de tejido cerebral) en relación al contenido cerebral del neurotransmisor inhibitorio de los animales del grupo control ($298.09 \pm 55.02 \mu\text{g/g}$).

Adicionalmente, se encontró diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre el peso corporal promedio de veinte ratones macho adultos (20 semanas) neurointoxicados neonatalmente con el GMS ($51.41 \pm 4.52 \text{ g}$) y de veinte animales pretratados neonatalmente con solución salina ($41.98 \pm 4.37 \text{ g}$). La comparación del peso promedio de los cerebros obtenidos por la técnica de Glowinsky & Iversen entre ambos grupos de animales, fue significativamente menor ($p < 0.001$) para el grupo de animales tratados con el GMS en relación al grupo control ($389.95 \pm 20.44 \text{ mg}$ vs $447.25 \pm 23.49 \text{ mg}$, para el grupo tratado con GMS y el grupo control, respectivamente).

Finalmente, por la importancia que representan las alteraciones endocrinas inducidas por la neurotoxicidad con el GMS, los resultados del seguimiento durante 30 días del perfil citológico vaginal, tanto en los animales del grupo control como en los

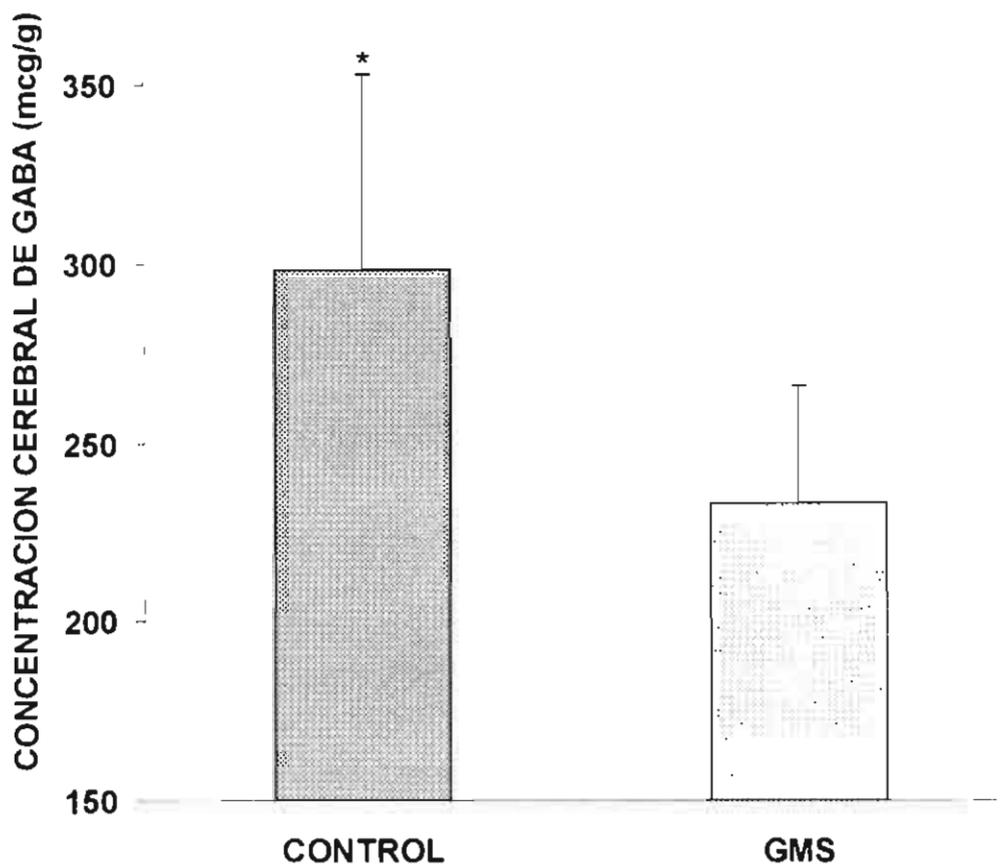
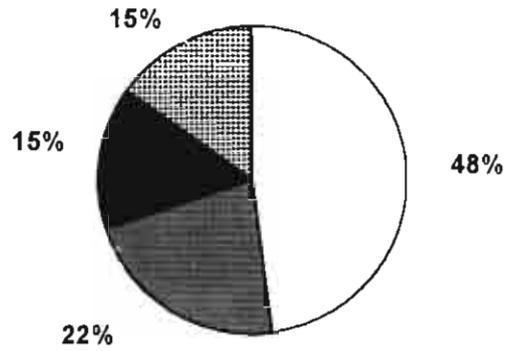


Figura 31. Concentración cerebral de GABA en ratones adultos que fueron neurointoxicados neonatalmente con el GMS y en animales del grupo control. Los resultados se expresan como el valor promedio en $\mu\text{g/g} \pm \text{DE}$. * $p < 0.05$.

neurointoxicados con el GMS, se muestran en la Figura 32. Como se puede apreciar la frecuencia del estadio en estro fue significativamente menor en el grupo de ratas neurointoxicadas neonatalmente con el GMS (13%) en relación a la frecuencia de presentación en estro del grupo control (48%); se encontró un predominio en estadio de metaestro en el grupo de ratas GMS (47%), respecto al mismo estadio en el grupo control (22%), al igual que un predominio de diestro en el grupo de animales neurointoxicados (26%) respecto a los controles (15%) y una frecuencia similar para ambos grupos en proestro (14% y 15% para el grupo neurointoxicado con el GMS y para el grupo control, respectivamente).

CONTROL

□ ESTRO ■ METAESTRO ■ DIESTRO ▨ PROESTRO



GMS

□ ESTRO ■ METAESTRO ■ DIESTRO ▨ PROESTRO

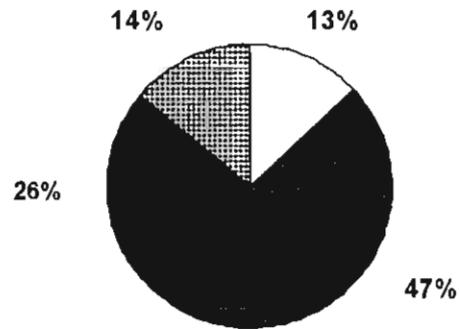


Figura 32. Distribución de frecuencias expresadas en términos porcentuales del estadio del ciclo estral en el grupo de ratas neurointoxicadas neonatalmente con el GMS y en ratas del grupo control, el frotis vaginal se realizó diariamente entre las 12 y 13 horas, durante 30 días (n de seis ratas hembra por grupo).

IX. DISCUSIÓN

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio, la administración parenteral de GMS en el periodo neonatal de los ratones indujo la neurotoxicidad, confirmada por la serie de manifestaciones anatómicas macroscópicas, endocrinas, metabólicas y conductuales que presentan los animales y que en su conjunto se les identifica como el "síndrome del GMS" (Olney, 1969; Olney, 1972; Olney y cols., 1977; Meister y cols., 1989; Meister, 1991; Chambille y Serviere, 1993; Tokuyama y Himms-Hagen, 1986; Young y cols., 1983; Iwase y cols., 1998). Estas alteraciones incluyen: acortamiento de la longitud del cuerpo, excesiva obesidad (Figura 1), acortamiento de la cola, lesión retiniana, criptorquidia, disminución de la capacidad reproductora, automutilación de la cola, así como alteración de la actividad exploratoria y locomotora.

Es importante señalar que la notable obesidad que presentan los animales neurointoxicados con el GMS, los cuales difieren significativamente en cuanto a la apariencia y el peso corporal de los animales control, no está relacionada con hiperfagia, por el contrario, los animales neurointoxicados consumen significativamente menos alimento y menos agua que los animales del grupo control. Con el esquema de dosis del GMS empleado en el presente estudio se induce una destrucción del 80 al 90% de las neuronas del núcleo arqueado, de la eminencia media del hipotálamo y áreas periventriculares (Olney, 1969; Pérez y Olney, 1972; Simpson y cols. 1977; Meister, 1991). Este hecho, se acepta, es el responsable de la serie de alteraciones neuroquímicas, endocrinas, metabólicas y conductuales.

Los resultados del presente estudio señalan cambios significativos en la susceptibilidad de los animales neurointoxicados neonatalmente con el GMS a los efectos agudos y crónicos del etanol, en relación con la susceptibilidad que mostraron los animales del grupo control. El análisis cuantitativo de las diferentes variables estudiadas, sugiere que la neurotoxicidad provocada en la etapa neonatal con el GMS da lugar a cambios permanentes, en la edad adulta, los animales se hacen más vulnerables a los efectos farmacotxicológicos característicos del alcohol como es la hipotermia, la hipnósis y el efecto letal. La mayor susceptibilidad que presentan los animales neurointoxicados posiblemente se vincule con modificaciones farmacodinámicas, ya que se sabe que la neurotoxicidad con el GMS reduce la actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD) en algunas áreas del SNC y en consecuencia, se produce una disminución en el contenido del GABA; esto permite explicar la modificación en el umbral de excitabilidad neuronal en los animales neurointoxicados con el GMS y la mayor susceptibilidad que presentan a las convulsiones inducidas eléctricamente (Campos y cols., 1991), a las convulsiones inducidas agudamente por el metrazol (Campos y cols., 1994) y al "kindling" químico inducido por el metrazol (Campos y cols., 1994; Castellanos y cols., 1998). Relacionado con lo anterior, la reducción en el contenido cerebral del neurotransmisor inhibitorio, podría dar lugar a un incremento en el número de receptores al GABA ("up regulation", anarregulación o regulación hacia arriba), fenómeno de plasticidad neuronal que se presenta cuando se reducen las concentraciones de los ligandos endógenos, cuando hay una denervación o cuando se destruyen selectivamente algunas poblaciones de sinapsis con neurotóxicos

específicos (Trendelenburg y cols., 1962). Los eventos mencionados propiciarían un incremento en la facilitación GABAérgica inhibitoria en respuesta al etanol (Suzdak y cols., 1986), existe evidencia que el etanol reduce la neurotransmisión glutamatérgica por que altera las concentraciones cerebrales del aminoácido excitatorio, su recaptura y su liberación; así mismo, tiene la capacidad de inhibir al receptor NMDA del glutamato (Hoffman y cols. 1989; Cumins y cols. 1990; Rassnick y cols. 1992; Nie y cols. 1993; Tsai y cols. 1995). Los antecedentes que sustentan una mayor susceptibilidad al etanol en los animales neurointoxicados con el GMS como consecuencia de una disminución de la neurotransmisión GABAérgica (Jennes y cols. 1984; Di Giorgio y cols. 1985; Meister y cols. 1989; Beas y cols. 1998) se apoyan en el presente estudio con la disminución del contenido cerebral del GABA determinada en los animales neurointoxicados con el aminoácido excitatorio.

Las concentraciones del GABA se realizaron en cerebro total y posiblemente la medición de las concentraciones cerebrales regionales aportarían mayor información ya que las modificaciones en las concentraciones de un ligando endógeno por la manipulación específica con un fármaco, pueden enmascarse al determinar ese ligando en cerebro total.

Específicamente, la posibilidad de que la mayor susceptibilidad al alcohol dependa de cambios en los procesos farmacocinéticos se descarta en el presente estudio, ya que los resultados de las observaciones sobre la evolución temporal de las concentraciones sanguíneas y el cálculo de los parámetros farmacocinéticos, no revelaron diferencias significativas entre el grupo de animales neurointoxicados con el GMS y el grupo tratado neonatalmente con solución salina.

En relación a la menor susceptibilidad que mostraron los animales neurointoxicados con el GMS, tanto a los efectos agudos como a los crónicos de los barbitúricos, (más marcada en el caso del tiopental), sugieren una relación con cambios permanentes en el SNC. A diferencia de lo que ocurre con el etanol, en la edad adulta hay una susceptibilidad significativamente menor a los efectos agudos y crónicos de los barbitúricos (tiopental, pentobarbital y fanobarbital) como son la hipotermia, la hipnósis y el efecto letal por depresión respiratoria a nivel de bulbo raquídeo. La menor susceptibilidad que presentan los animales neurointoxicados, en relación con los animales del grupo control, posiblemente también estén ligadas con la reducción de las concentraciones cerebrales del GABA en los animales neurointoxicados, el umbral de excitabilidad disminuye y por lo tanto se requieren dosis más altas de los barbitúricos para inducir los efectos GABAérgicos inhibitorios, equivalentes a las dosis aplicadas al grupo control. Al respecto se sabe que los barbitúricos se unen a un sitio alostérico del receptor de GABA y se facilita la acción GABAérgica inhibitoria al aumentar la duración de la apertura de los canales operados por el GABA. Nuevamente, como se indicó, los cambios en el umbral de excitabilidad se apoyan por la mayor susceptibilidad a las convulsiones eléctricas, a las convulsiones químicas inducidas con pentilinetetrazol y al "kindling" químico inducido por el metrazol en los animales neurointoxicados con el aminoácido excitatorio. Los efectos diferenciales en la susceptibilidad a los barbitúricos, aún cuando el mecanismo de acción es el mismo, parecen depender de la diferente capacidad que tienen estos agentes para ejercer un efecto facilitador GABAérgico. Al respecto se sabe que el pentobarbital ejerce un efecto facilitador más eficaz y como bloqueador

de los canales de Ca^{++} operados por voltaje es más potente que el fenobarbital (Twyman y cols., 1989; French-Mullen, 1993; Goodman y cols., 2000; Trevor y Way, 2001; Alexander y cols., 2001). Los hechos que sugieren que la menor susceptibilidad al tiopental se asocia con procesos farmacodinámicos no descarta la posibilidad de que estos cambios dependan de modificaciones en los procesos farmacocinéticos.

Los tiobarbitúricos como el tiopental tienen un coeficiente de partición lípido/ agua muy alto y los animales neurointoxicados con el GMS presentan como característica distintiva una excesiva obesidad con alto contenido en grasa, lo que propicia fenómenos de redistribución del tiopental con la consecuente acumulación del compuesto en el tejido adiposo limitando su acceso al SNC y por lo tanto, una menor intensidad de los efectos característicos del tiopental. Aunado a lo anterior, debemos considerar que el tiopental es un barbitúrico de inducción y recuperación rápida, el pentobarbital es un oxibarbitúrico de acción intermedia en tanto que el fenobarbital es de acción prolongada, aspectos farmacocinéticos que se pueden correlacionar con la diferente susceptibilidad que presentan los animales neurointoxicados a estos barbitúricos; incluyendo la susceptibilidad al pentobarbital, demostrada por nuestro grupo (Gómez y cols., 1991).

Por otra parte, el incremento en la susceptibilidad al diazepam y al GABA, probablemente también esté relacionado con la plasticidad sináptica como resultado del aumento en el número de receptores al GABA, si consideramos que el mecanismo de acción de las benzodiazepinas, a diferencia del etanol y de los barbitúricos, implica su interacción con un sitio de unión específico del complejo

macromolecular del receptor GABA_A. En estas condiciones, si en los animales neurointoxicados el número de receptores para el neurotransmisor inhibitorio se incrementa habrá una mayor respuesta al GABA exógeno administrado. un mayor número de sitios de unión para el diazepam y en consecuencia, un incremento en la facilitación presináptica GABAérgica a la administración de la benzodiazepina.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio no se descarta la posibilidad de que la mayor susceptibilidad a los depresores del SNC, en los casos de neurotoxicidad neonatal con GMS, esté ligada a cambios en los procesos farmacocinéticos de estos fármacos. El contenido de grasa de los animales neurointoxicados con el GMS es ostensiblemente mayor en relación a los animales control; sin embargo, el tamaño del cerebro es significativamente menor en los animales neurointoxicados, comparado con el peso cerebral de los animales del grupo control. No obstante, hay que considerar que la administración de los agonistas GABAérgicos se realizó en función del peso corporal.

Por otro lado, un aspecto que particularmente llama la atención es que el peso corporal se reduce drásticamente bajo condiciones de tratamiento crónico con el etanol, los barbitúricos o el diazepam; la magnitud de la pérdida de peso corporal osciló entre el 24 y el 50 % del peso corporal inicial, independientemente del fármaco utilizado. En todos los casos, la diferencia fue altamente significativa ($p < 0.001$) cuando se le aplicó la prueba de t pareada, sin embargo, desconocemos el significado de estos hallazgos.

Por otra parte, la observación de la baja frecuencia del estadio en estro de las ratas neurointoxicadas con el GMS confirma, indirectamente, que la lesión ocurre a nivel

del núcleo arqueado del hipotálamo, estructura que produce la hormona liberadora de gonadotropinas y que en las células gonadotropas de la hipófisis estimula la secreción de la hormona folículo estimulante y de la hormona luteinizante, responsables del estro.

Finalmente, el planteamiento de estas posibles explicaciones de los cambios en la susceptibilidad de los animales neurointoxicados con el GMS a los agonistas GABAérgicos, puede caer en el terreno especulativo, ya que su fundamentación implica otra serie de estudios como la cuantificación del número de receptores en áreas específicas del SNC. El propósito del presente estudio fue estudiar los cambios en la susceptibilidad a los efectos farmacotológicos de los agonistas GABAérgicos de los animales neurointoxicados con el aminoácido excitatorio, que a dosis altas, constituye un agente excitotóxico. Más allá del aspecto mecanicista, es importante considerar el factor toxicológico ligado al riesgo que entraña el consumo indiscriminado de alimentos que contienen GMS que, potencialmente, podría comportarse como agente neurotóxico.

Cobra aún mayor relevancia toxicológica si el consumo del GMS se realiza durante el embarazo, ya que el aminoácido excitatorio atraviese la barrera placentaria y se pueden alcanzar concentraciones altas en el SNC del producto.

X. CONCLUSIONES

1. La neurotoxicidad provocada por la administración del GMS, en la etapa neonatal de los animales, induce alteraciones permanentes en los roedores, los que en la edad adulta, son más vulnerables a los efectos de fármacos como el etanol, el diazepam y al GABA.
2. En contraste con la mayor susceptibilidad al etanol, al diazepam y al GABA que presentan los animales neurointoxicados con el GMS, en éstos se observó una menor susceptibilidad a los barbitúricos como el tiopental y el fenobarbital.
3. Independientemente del agonista GABAérgico administrado, hubo una pérdida significativa del peso corporal en los animales neurointoxicados con el GMS, bajo condiciones de administración crónica de los diferentes fármacos.
4. La susceptibilidad diferencial a los agonistas GABAérgicos estudiados depende de modificaciones en los procesos farmacodinámicos y farmacocinéticos inducidos por el GMS.
5. Por analogía, potencialmente se producen cambios en la susceptibilidad a los fármacos agonistas y antagonistas que interaccionan con los sistemas neurotransmisores afectados por la neurotoxicidad inducida con el GMS.
6. El consumo indiscriminado del aminoácido excitatorio en los alimentos, particularmente durante el embarazo, en dosis altas, puede dar lugar a fenómenos de excitotoxicidad.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ABE M, SAITO M y SHIMAZU T. Neuropeptide Y in specific hypothalamic nuclei of rat treated neonatally with monosodium glutamate. **Brain Res** 1990; 24: 289-291.
2. ALEXANDER SPH, MATHIE A y PETERS JA. 2001 nomenclature supplement. **TIPS**. Twelfth ed. 1-146, 2001.
3. ALI MM, BAWARI M, MISRA UK y BABU GN. Locomotor and learning deficits in adult rats exposed to monosodium-L-glutamate during early life. **Neurosci Lett** 2000; 284: 57-60.
4. AMMAR AC y NIGEL LP. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. **Curr Opin Neurol** 2000; 13(4): 397-405.
5. ANTONI FA, KANYICSKA B, MEZEY E y MAKARA GB. Neonatal treatment with monosodium-L-glutamate: differential effects on growth hormone and prolactin release induced by morphine. **Neuroendocrinology** 1982; 35:231-235.
6. APPEL SH. Excitotoxic neuronal cell death in amyotrophic sclerosis. **TINS** 1993; 16: 3-5.
7. ARAI A y LYNCH G. Factors regulating the magnitude of long-term potentiation induced by theta pattern stimulation. **Brain Res** 1992; 598:173-184.
8. AVOLI M. Excitatory amino acid receptors in the human epileptogenic neocortex. **Epilepsy Res** 1991; 10: 33-40.
9. BACHURIN S, TKACHENKO S, BASKIN I, LERMONTOVA N, MUKHINA T, PETROVA L, USTINOV A, PROSHIN A, GRIGORIEV V, LUKOYANOV N, PALYULIN V y ZEFIROV N. Neuroprotective and cognition-enhancing properties of MK-801 flexible analogs. Structure-activity relationships. In: Neuroprotective agents (Slikker W & Tremblay B. Ed). **Ann New York Acad Sci** 2001; 939: 219-236.
10. BALBO SL, GRAVENA C, BONFLEUR ML y DE FREITAS MPC. Insulin secretion and acetylcholinesterase activity in monosodium l-glutamate-induced obese mice. **Hormone Research** 2000; 54: 186-191.
11. BARNES JM y HENLEY JM. Molecular characteristics of excitatory amino acid receptors. **Prog Neurobiol** 1992; 39: 113-133.
12. BASHIR ZI, BORTOLOTTO ZA, DAVIES CH, BERRETA N, IRVING AJ, SEAL AJ, HENLEY JM, JANE DE, WATKINS JC y COLLINGRIDGE GL. Induction of LTP in the hippocampus need synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. **Nature** 1993; 363: 347-350.

13. BAWIN SM, SATMARY WM Y ADEY WR. Roles of the NMDA and quisqualate/kainate receptors in the induction and expression of kindled bursts in rat hippocampal slices. **Epilepsy Res** 1993; 15: 7-13.
14. BEAS ZC, SANCHEZ RMY, UREÑA GME Y FERIA VA. Effect of neonatal exposure to monosodium L-glutamate on regional GABA release during postnatal development. **Neurochem Internac** 1998; 33: 217-232.
15. BEN-ARI Y, TREMBRAY E y OTTERSEN OP. Injection of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. **Neurosci** 1980; 5: 515-528.
16. BLISS TVP y COLLINGRIDGE GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature** 1993; 361: 31-39.
17. BODNAR RJ, PORTZLINE T, y NILAVER G. Differential alterations in opioids analgesia following neonatal MSG treatment. **Brain Res Bull** 1985; 15: 299-305.
18. BODNAR RJ, MANN EP, ROMERO MT y TRUESDELL. Loss of morphine hyperphagia following neonatal monosodium glutamate treatment in rat. **Life Sci** 1986; 38: 947-950.
19. BONDY SC y LEE DK. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. **Brain Res** 1993; 610: 229-233.
20. BORMANN J. The 'ABC' of GABA receptors. **TIPS** 2000; 21: 16-19.
21. BORTOLOTTA ZA Y COLLINGRIDGE GL. Characterization of LTP induced by the activation of glutamate metabotropic receptors in area CA1 of the hippocampus. **Neuropharmacol** 1993; 32: 1-9.
22. BOWEN DM. Treatment of Alzheimer's disease. Molecular pathology versus neurotransmitter-based therapy. **Br J Psychiat** 1990; 157: 327-330.
23. BROWN TH, CHAPMAN PF, KAIRISS EW y KEENAN CL. Long-term synaptic potentiation. **Science** 1988; 242: 724-727.
24. BULLOCK R, ZAUNER A, MYSEROS JS, MARMAROU A, WOODWARD JJ y JOUNG HF. Evidence for prolonged release of excitatory amino acids in severe human head trauma. Relationship to clinical events. **Ann New York Acad Sci** 1995; 765: 290-297.
25. BURDEN RM, SCHAINER B y KAIYES J. Monosodium glutamate: arcuate effect of oral and subcutaneous administration of the arcuate nucleus. **Nature** 1974; 233: 58-60.
26. CAGAN RH, TORII K y KARE MR. Biochemical studies of glutamate taste receptors: the synergistic taste effect of L-glutamate and 5'-ribonucleotides.

Glutamic acid: **Advances in Biochemistry and Physiology** (Filer et al Ed.). Raven Press NY, 1979; 1-9.

27. CAMPOS SAE, GOMEZ AC, SANVICENTE SL, CASTELLANOS PC, AGUILAR MH, SERVIN HD y LUJAN EM. Susceptibilidad a las convulsiones inducidas eléctricamente en el ratón tratado neonatalmente con glutamato monosódico. **XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas**, Colima. Col., 1991.
28. CAMPOS SAE, ROLDAN RG, GALINDO MA, VARGAS GA, GOMEZ AC, LUJAN EM y CASTELLANOS PC. Los ratones tratados con glutamato monosódico en la etapa neonatal son más sensibles al "kindling" inducido por el pentilentetrazol. **XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas**, Mérida, Yuc., 1994.
29. CARLSSON M y CARLSSON A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia-implications for schizophrenia and Parkinson's disease. **TINS** 1990; 13: 272-276.
30. CASTELLANOS PCA. Cambios en la excitabilidad neuronal en la rata y el ratón producidos por el tratamiento neonatal con Glutamato monosódico. **Tesis de Maestría en Biología Experimental**, Universidad Autónoma Metropolitana, 1995.
31. CASTELLANOS CA, ROLDÁN G, GÓMEZ C, VARGAS GA, GALINDO MA, ROMAN RR y CAMPOS SAE. Enhancement of pentylenetetrazol-induced kindling in mice treated neonatally with monosodium glutamate. **Proc Wes Pharmacol Soc** 1998; 41: 53-54.
32. CAZEVIEILLE CH, MULLER A, MEYNIER F y BONNE C. Superoxide and nitric oxide cooperation in hypoxia/reoxygenation-induced neuron injury. **Free Rad Biol Med** 1993; 14: 389-395.
33. COLLINGRIDGE GL y LESTER RAJ. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol Rev** 1989; 40: 143-208.
34. COLLINGRIDGE GL y SINGER W. Excitatory amino acids receptors and synaptic plasticity. **TIPS** 1990; 11: 290-296.
35. COYLE JT. Neurotoxic action of kainic acid. **J Neurochem** 1983; 41: 1-11.
36. COYLE JT y SCHWARCZ R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. **Nature** 1976; 263: 244-246.
37. CUMMINS JT, SACK M y VON HUNGEN K. The effect of chronic ethanol on glutamate binding in human and rat brain. **Life Sci** 1990; 47: 877-882.

38. CURTIS DR y WATKINS JC. The excitation and depression of spinal neurons by structurally related aminoacids. **J Neurochem** 1960; 6: 117-141.
39. CHAMBILLE I y SERVIERE J. Neurotoxic effects of neonatal injections of monosodium L-glutamate (L-MSG) on the retinal ganglion cell layer of the golden hamster: anatomical and functional consequences on the circadian system. **J Comp Neurol** 1993; 338: 67-82.
40. CHIZH B, HEADLEY PM y TZSCHENETKE TM. NMDA receptors antagonists as analgesics: focus on the NR2B subtype. **TIPS** 2001; 22: 636-642.
41. DALBY NO y THOMSEN CH. Modulation of seizure activity in mice by metabotropic glutamate receptor ligands. **J Pharmacol Exp Ther** 1996; 276: 516-522.
42. DANYSZ W, PARSONS CG, BRESINK I y QUACK G. Glutamate in disorders. **Drug News Perspect** 1995; 8: 261-277.
43. DAWSON VL, DAWSON TM, BARTLEY DA, ULI GR y SNYDER SH. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. **J Neurosci** 1993; 13: 2651-2666.
44. DAWSON VL, DAWSON TM, LONDON ED, BRED DS y SNYDER SH. Nitric oxide mediate glutamate neurotoxicity in primary cortical culture. **Proc Acad Sci USA** 1991; 88: 6368-6371.
45. De BLASI A, CONN PJ, PIN JP y NICOLETTI F. Molecular determinants of metabotropic glutamate receptors signaling. **TIPS** 2001; 22: 114-120.
46. DEV KK, NAKANISHI S y HENLEY JM. Regulation of mglu7 receptors by proteins that interact with the intracellular C-terminus. **TIPS** 2001; 22: 355-361.
47. **Diario Oficial de la Federación**. Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, miércoles 22 de agosto de 2001; 113-160.
48. DI GIORGIO RM, DE LUCA GC, GAROFALO MP, CONTI C y LENTILE R. GABA-ergic system in brain regions of glutamate-lesioned rats. **Italian J Biochem** 1985; 34(1):19-28.
49. DINGLEDINE R, BORGES K, BOWIE D y TRAYNELIS S. The glutamate receptors ion channels. **Pharmacol Rev** 1999; 51: 8-61.
50. DINGLEDINE R y CONN PJ. Peripheral glutamate receptors: molecular biology and role in taste sensation. **J Nutrition** 2000; 130: 1039-1042.
51. DINGLEDINE R, MCBAIN CJ y McNAMARA JO. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. **TIPS** 1990; 11:334-338.

52. DOLNIKOFF M, HIDALGO MA, MACHADO UF, LIMA FB y HERRERA E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. Internac. **J Obesity Related Metabolic Disorders** 2001; 25: 426-433.
53. DRAY A, URBAN L y DICKENSON A. Pharmacology of chronic pain. **TIPS** 1994; 15: 190-197.
54. ERECINSKA M y SILVER IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Prog Neurobiol** 1990; 35: 245-296.
55. FAGG GE y FOSTER AC. Amino acid neurotransmitters and their pathways in mammalian central nervous system. **Neurosci** 1983; 9(4): 701-719.
56. FERNSTROM JD y GOLDSMITH PC. Exogenous glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice. **Neuroendocrinology** 1998; 68(2): 77-78.
57. FILER L.J. Glutamic acid: **Advances in biochemistry and physiology**. Raven Press, NY, 1979.
58. FFRENCH-MULLEN JMH, BARKER JL y ROGAWSKI MA. Calcium current block by (-)-pentobarbital, phenobarbital and CHEB but not (+)-pentobarbital in acutely isolated hippocampal CA1 neurons: comparison with effects on GABA-activated Cl⁻ current. **J Neurosci** 1993; 13: 3211-3221.
59. FRIEDER B y GRIMM VE. Prenatal monosodium glutamate causes long-lasting cholinergic and adrenergic changes in various brain regions. **J Neurochem** 1987; 48: 1359-1365.
60. FRIEDMAN LK, PELLEGRINI-GIAMPIETRO DE, SPERBER EF, BENNETT MV y MOSSHE SL. Kainate-induced status epilepticus alters glutamate GABA receptors gene expression in adult rat hippocampus.: an *in situ* hybridization study. **J Neurosci** 1994; 14: 2697-2707.
61. GILL SS, MULLER RW, McGUIRE PF y PULIDO OM. Potential target sites in peripheral tissues for excitatory neurotransmission and excitotoxicity. **Toxicol Pathol** 2000; 28: 277-284.
62. GLOWINSKY J y IVERSEN LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. The disposition of ³H-Norepinephrine, ³H-Dopamine and ³H-Dopa in various regions of the brain. **J Neurochem** 1966; 3: 655-669.

63. GOLZAN HY, BEN-ARI Y. NMDA receptor redox sites: are they target for selective neuronal protection ?. **TIPS** 1995; 16: 368-374.
64. GOMEZ C, LUJAN M, RODRIGUEZ R, SERVIN D y CAMPOS-SEPULVEDA AE. Neonatal monosodium glutamate reduced pentobarbital hypnotic susceptibility in adult mice. **Proc West Pharmacol Soc** 1991; 34: 469-471.
65. GREENAMYRE JT. The role of glutamate in neurotransmission and neurologic disease. **Arch Neurol** 1986; 43:1058-1063.
66. GREENAMYRE JT, MARAGOS WF, ALBIN RL, PENNEY JB y YOUNG AB. Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat** 1988; 12: 421-430.
67. GOODMAN AG, HARDMAN JG, LIMBRID LE. Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ten Ed. McGraw-Hill, 2000.
68. HAYASHI T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. **Br J Med** 1954; 3: 183-192.
69. HEVERS W y LUDDENS H. The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. **Mol Neurobiol** 1998; 18: 35-86.
70. HEYWOOD R y WORDEN AN. Glutamate toxicity in laboratory animals. En. *Glutamic acid: Advances in Biochemistry and Physiology* (Filer. Ed.) Raven Press. NY, 1979; 203-215.
71. HIKIJI M, TOMITA H, ONO M, FUJIWARA Y y AKIYAMA K. Increase of kainate receptor mRNA in the hippocampal CA3 of amygdala-kindled rats detected by *in situ* hybridization. **Life Sci** 1993; 53: 857-864.
72. HOFFMAN PL, RABE CS, MOSES F y TABAKOFF B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. **J Neurochem** 1989; 52:1937-1940.
73. HOWARD AD, McALLISTER G, FEIGHNER SD, LIU Q, NARGUND RP VAN der PLOEG LHT y PATCHETT AA. Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. **TIPS** 2001; 22: 406-408.
74. HYMAN BT, PENNEY JB, BLACKSTONE CD y YOUNG AB. Localization of non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in normal and Alzheimer hippocampal formation. **Ann Neurol** 1994; 35:31-37.
75. ISHIDA M, SAITOH T y SHINOZAKI H. A new metabotropic glutamate receptor agonist: developmental change of its sensitivity to receptors in the newborn rat spinal cord. **Neurosci Lett** 1993; 160:156-158.

76. IVERSEN LL. MK-801 (Dizocilpine maleate)-NMDA receptor antagonist. **Res Biochem Internat** 1994; X(1): 1-4.
77. IVERSEN L, MULVIHILL E, HALDELMAN B, DIEMER NH, KAISER F, SHEARDOWN M y KRISTENSEN P. Changes in metabotropic glutamate receptor mRNA levels following global ischemia: increase of a putative presynaptic subtype (mGluR4) in highly vulnerable brain rat areas. **J Neurochem** 1994; 63: 625-633.
78. IWASE M, YAMAMOTO M, LINO K, ICHIKAWA K, SHINOHARA N, YOSHINARI M y FUJISHIMA M. Obesity induced by neonatal monosodium glutamate treatment in spontaneously hypertensive rats: an animal model of multiple risk factors. **Hypertension Res** 1998; 21: 1-6.
79. JACQUIN TG, PASQUIER C, GILLET B, BELOEIL JC y CHAMPAGNAT J. Metabolic acidosis induced by N-methyl-D-aspartate in brain slices of the neonatal rat: P- and H-magnetic resonance spectroscopy. **J Neurosci Lett** 1988; 92: 258-290.
80. JENNES L, STUMP WE, BISSETTE G y NEMEROFF CB. Monosodium glutamate lesions in rat hypothalamus studied by immunohistochemistry for gonadotropin releasing hormone, neurotensin, tyrosine hydroxylase, and glutamic acid decarboxylase and by autoradiography for (³H)estradiol. **Brain Res** 1984; 308: 245-253.
81. JONES AW y SCHUBERTH J. Computer-aided headspace gas chromatography applied to blood-alcohol analysis: importance of online process control. **J Forensic Sci** 1989; 34: 1116-1127.
82. KATZ RJ. Neonatal monosodium glutamate differentially alters two models of behavioral activity in conjunction with reduced hypothalamic endorphins. **Physiol Behav** 1983; 31: 147-151.
83. KIENDROWSKI L, COSTA E y WROBLEWSKI JT. Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. **J Neurochem** 1992; 58: 335-341.
84. KIM TW, KANG KB, CHOUNG HK, PARK KH y KIM DM. Elevated glutamate levels in the vitreous body on an in vivo model of optic nerve ischemia. **Arch Ophthalmology** 2000; 118: 533-536.
85. KINOSHITA, Monosodium glutamate. **Merck Index** 1961; U.S. pats 3,002,889 y 3,003,925.
86. KIZER JS, NEMEROFF, CHB y YOUNGBLOOD WW. Neurotoxic amino acid and structurally related analogs. **Pharmacol Rev** 1978; 29: 301-318.

87. KOROSHETZ W y MOSKOWITZ MM. Emerging treatment for stroke in humans **TIPS** 1996; 17: 227-233.
88. KORPI ER. Role of GABA_A receptors in the actions of alcohol and in alcoholism: Recent advances. **Alcohol** 1994; 29:115
89. KOVACS M, KINEMAN RD, SCHALLY AV, FLERKO B y FROHMAN LA. Increase in mRNA concentration of pituitary receptors for growth hormone-releasing hormone and growth hormone secretagogues after neonatal monosodium glutamate treatment. **J Neuroendocrinology** 2000; 12: 335-341.
90. KRICKA LJ y CLARK PMS. Biochemistry of alcohol and alcoholism. University of Birmingham, John Wiley & Sons, 1979.
91. KRIEGER D, y KIZER JS. Brain ACTH and endorphin reduced in rat with monosodium glutamate-induced arcuate nuclear lesions. **Nature** 1979; 278: 562-563.
92. KUBO T, KOHIRA R, OKANO T y ISHIKAWA K. Neonatal glutamate can destroy the hippocampal CA1 structure and impair discrimination learning in rats. **Brain Res** 1993; 616: 311-314.
93. LAFON-CAZAL M, PIETRI S, CULCASI M, y BOCKAERT J. NMDA-depent superoxide production and neurotoxicity. **Nature** 1993; 364: 535-537.
94. LAHTINEN H, CASTREN E, MIETTINEN R, YLINEN A, PALJÄRVI L y RIEKKINEN PJ. NMDA-sensitive (³H) glutamate binding in the epileptic rat hippocampus: an autoradiographic study. **Neuroreport** 1993; 4: 45-48.
95. LAWLOR BA y DAVIS KL. Does modulation of glutamatergic function represent a viable therapeutic strategy in Alzheimer's disease ?. **Biol Psychiat** 1992; 31: 337-350.
96. LESSER JB, KOORN R, VLOKA JD, KURODA MM y THYS DM. The interaction of temperature with thiopental and etomidate on extracellular dopamine and glutamate levels in Wistar-kyoto rats subjected to forebrain ischemia. **Acta Anaest Scan** 1999; 43: 989-998.
97. LITCHFIELD JT y WILCOXON F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J Pharmacol Exp Ther** 1949; 96: 99-113.
98. LORENE MN, CHANTAL M, LONGSTRETH WT y VALERIE M. Population-based case-control study of amyotrophic lateral sclerosis in western Washington State. **Am J Epidemiol** 2000; 151: 164-173.

99. LUCAS DR y NEWHOUSE JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. **AMA Arch Ophthalmol** 1957; 58: 193-201.
100. MACHO L, FICKOVA MJ y ZORAD S. Late effects of posnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiol Res** 2000; 49: 79-85.
101. MAREN S, TOCCO G, STANDLEY S, BRAUDRY M y THOMSON RF. Postsynaptic factors in the expression of the long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90: 9654-9658.
102. MARINI AM, CHOI J y LABUTTA R. Synaptic deprivation and age-related vulnerability to hypoxic-ischemic neuronal injury. A hypothesis. In: Neuroprotective agents (Slikker & Trembly Ed.). **Ann New York Acad Sci** 2001; 939: 238-253.
103. MARTINKOVA A, LENHARDT L y MOZES S. Effect of neonatal MSG treatment on day-night alkaline phosphatase activity in the rat duodenum. **Physiol Res** 2000; 49: 339-345.
104. MASU M, NAKAJIMA Y, MORIYOSHI K, ISHII T, AKAZAWA C y NAKANASHI S. Molecular characterization of NMDA and metabotropic glutamate receptors. In: Neuroprotective agents (Slikker W & Trembly Ed.). **Ann New York Acad Sci** 2001; 939:153-163.
105. MATHIS C y UNGERER A. Comparative analysis of seizures induced by intracerebroventricular administration of NMDA, kainate and quisqualate in mice. **Exp Brain Res** 1992; 88: 277-282.
106. MATYJA E y ALBRETCH J. Ultrastructural evidence that mercuric chloride lower the threshold for glutamate neurotoxicity in an organotypic culture of rat cerebellum. **Neurosci Lett** 1993; 158:155-158.
107. McDONALD JW, FIX AS, TIZZANO JP y SCHOEPP DD. Seizures and brain injury in neonatal rats induced by 1s,3r-acpd, a metabotropic glutamate receptor agonist. **J Neurosci** 1993; 13: 4445-4455.
108. McGAUGH JL e IZQUIERDO I. The contribution of pharmacology to the research on the mechanism of memoria formation. **TIPS** 2000, 21: 208-210.
109. McNAMARA, J. O. The neurobiological basis of epilepsy. **TINS** 1992; 15: 357-359.
110. McNAMARA JO. Excitatory amino acid receptors and epilepsy. **Curr Opin Neurol Neurosurg** 1993; 6: 583-587.

111. MEISTER B, CECCATELLI S, HOKFELT T, ANDÉN NE, ANDÉN M y THEODORSSON E. Neurotransmitter, neuropeptides and binding sites in the mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. **Exp Brain Res** 1989; 76: 343-368.
112. MEISTER B. Monosodium glutamate (MSG) lesions. En: Lesions and transplantation (Conn, P. Michael Ed.). Serie: **Methods in Neurosciences**. USA. Acad Press, vol 7, 1991.
113. MELDRUM B y GARTHWAITE J. Excitatory amino acids neurotoxicity and neurodegenerative disease. **TIPS** 1990; 11: 379-387.
114. MELDRUM BS. Excitatory amino acids receptors and their role in epilepsy and cerebral ischemia. **Ann New York Acad Sci** 1995; 757: 492-505.
115. MILLER LC y TAINTER ML. Estimation of ED50 and its error by means of Logarithmic-Probit graph paper. **Proc Soc Biol Med** 1944; 57: 261-265.
116. MISKOWIAK B, KESA B, LIMANOWSKI A, PARTYKA M y FILIPIAK B. Long-term effect of neonatal monosodium glutamate (MSG) treatment on reproductive system of the female rat. **Folia Morphologica** 1999; 58: 105-113.
117. MISTLBERGER RE y ANTLE MC. Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat. **Brain Res** 1999; 842: 73-83.
118. MODY I y McDONALD JF. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{++} release. **TIPS** 1995; 16: 356-359.
119. MORHENN VB, WALEH NS, MANSBRIDGE JN, UNSON D, ZOLOTOREV A, CLINE P y TOLL L. Evidence for an NMDA receptor subunit in human keratinocytes. **Eur J Pharmacol** 1994; 268: 409-414.
120. MORI N, WADA JA y KUMASHIRO H. Transfer between kindling induced either by l-glutamate or l-aspartate and electrical stimulation in rats. **Brain Res** 1989; 498:163-166.
121. MORRIS MJ, TORTELLI CF, FILIPPIS A y PROIETTO J. Reduce BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. **Regulatory Peptides** 1998; 76: 441-447.
122. MORONI F, LUZZI S, FRANCHI-MICHELLI S y ZILLETTI L. The presence of N-methyl-D-aspartate-type receptors for glutamic acid in the guinea pig myenteric plexus. **Neurosci Lett** 1986; 68: 57-72..

135. OLNEY JW, FULLERT y DE GUBAREFF T. Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate treated rats. **Brain Res** 1979; 176: 91-100.
136. OLNEY JW, FULLER TA, COLLINS RC y DE GUBAREFF T. Systemic dipiperidinoethane mimics the convulsivant and neurotoxic actions of kainic acid. **Brain Res** 1980; 200: 231-235
137. OLNEY JW. Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. **Biol Psychiatry** 1989; 26: 505-525.
138. OLNEY JW. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 1990; 30: 47-71.
139. OPS. Codigos internacionales de ética de la investigación. **Bol Sanit Panam** 1990; 108. 625-641.
140. PARK CH, CHOI SH, PIA Y, KIM HS, JEONG SJ, RAH JC, LEE JH, CHANG K, JUNG YJ y SUH YH. Glutamate and aspartate impair memory retention and damage hypothalamic neurons in adult mice. **Toxicol Lett** 2000; 115: 117-125.
141. PAUWELS PJ y LEYSEN JE. Blockade of nitric oxide formation does not prevent glutamate-induced neurotoxicity in neuronal cultures from rat hippocampus. **Neurosci Lett** 1992; 143: 27-30.
142. PELAEZ B, BLAZQUEZ JL, PASTOR FE, SANCHEZ A y AMAT P. Lectinhistochemistry and ultrastructure of microglia response to monosodium glutamate-mediated neurotoxicity in arcuate nucleus. **Histol Histopathol** 1999; 14: 165-174.
143. PEOPLES RW y TABAKOFF B. The role of the NMDA receptors in ethanol withdrawal. **EXS** 1994; 71:61
144. PEREZ VJ y OLNEY JW. Accumulation of glutamic acid in the arcuate nucleus of the hypothalamus of the infant mouse following subcutaneous administration of monosodium glutamate. **J Neurochem** 1972; 19: 1777-1782.
145. PHILLIS JW y WALTER GA. Hypoxia/hypotension evoked release of glutamate and aspartate from the rat cerebral cortex. **Neurosci Lett** 1989; 106: 147-151.
146. PIOMELLI D, GIUFFRIDA A, CALIGNANO A y FONSECA FR. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. **TIPS** 2000; 21: 218-224.

147. PITTALUGA A y RAITERI M. N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and non-NMDA receptor regulating hippocampal norepinephrine release. Location on axon terminals and pharmacological characterization. **J Pharmacol Exp Ther** 1992; 260: 232-237.
148. PORTER RHP y ROBERTS PJ. Glutamate metabotropic receptor activation in neonatal rat cerebral cortex by sulphur-containing excitatory amino acids. **Neurosci Lett** 1993; 154:78-80.
149. PREZEAU L, CARRETTE J, HELPAP B, CURRY K, PIN JP y BOCKATERT J. Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors in several types of brain cells in primary cultures. **Mol Pharmacol** 1994; 45: 570-577.
150. RASSNICK S, D'AMICO E, RILEY E, PULVIRENTI L, ZIEGLGANSBERGER W y KOOB GF. GABA and nucleus accumbens glutamate neurotransmission modulate ethanol self-administration in rats. **Ann New York Acad Sci** 1992; 654: 502-505.
151. RETZ KC y COYLE JT. Effects of kainic acid on high-energy metabolites in the mouse striatum. **J Neurochem** 1982; 38: 196 -203.
152. RIEDEL G y REYMANN K. An antagonist of the metabotropic glutamate receptor prevents LTP in dentate gyrus of freely moving rat. **Neuropharmacology** 1993; 32: 929-931.
153. ROMAGNANO MA, CHAFEL TL, PILCHER WH y JOSEPH SA. The distribution of enkephalin in the medio-basal hypothalamus of the mouse brain. **Bain Res** 1982; 236: 479-504.
154. ROTHMAN SM. Excitotoxins: possible mechanisms of action. **Ann New York Acad Sci** 1992; 132-139.
155. SCALLET AC y OLNEY JW. Component of hypothalamic obesity: bipiridyl-mustard lesions add hyperphagia to monosodium glutamate induced hyperinsulinemia. **Brain Res** 1986; 374: 380-384.
156. SCHAWARCZ R, SCHOLZ D y COYLE JT. Structure activity relation for the neurotoxicity of kainic acid derivatives and glutamate analogues. **Neuropharmacology** 1978; 17: 145-151.
157. SCHATZKI A, McMILLIAN M y MILLER LG. Glutamate, kainate and quisqualate enhance GABA-dependent chloride uptake in cortex. **Brai Res Bull** 1990; 25: 239-243.

158. SCHOEPP DD y CONN PJ. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. **TIPS** 1993; 14: 13-20.
159. SCHRÖDER H, BECKER A y LÖSSNER B. Glutamate binding to brain membranes increased in pentylenetetrazole-kindled rat. **J Neurochem** 1993; 60: 1007-1011.
160. SHIN C, TAMAKI Y, WILSON JT, BUTLER L y SAKAGUCHI T. NMDA-receptor mediated electrical epileptogenesis in the organotypic culture of rat hippocampus. **Brain Res** 1992; 589:129-134.
161. SIMPSON EL, GOLD RM, STANDISH LJ y PELLETT PL. Axon-sparing brain lesioning technique: the use of monosodium-L-glutamate and other amino acids. **Science** 1977; 198: 515-517.
162. SINSKY M y DONNERER J. Evidence for a neurotransmitter role of glutamate in guinea pig myenteric plexus neurons. **Neurosci Lett** 1998; 258: 109-112.
163. SKERRY TM y GENEVER PG. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. **TIPS** 2001; 22: 174-181.
164. SMIRNOVA T, LAROCHE S, ERRINGTON ML, HICKS AA, BLISS TVP y MALLETT J. Transsynaptic expression of a presynaptic glutamate receptor during hippocampal long-term potentiation. **Science** 1993; 262: 433-436
165. STAUBLI U, ROGERS G y LYNCH G. Facilitation of glutamate receptors enhances memory. **Proc Natl Acad Sci** 1994; 91: 777-781.
166. STERMAN M., KATER CE, EGAMI M, SENNA DE ANDRADE I Y MARMO MR. Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterone in the rat. **Neuroendocrinology** 1988; 48:465-649.
167. STONE TW. CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Glutamate, **CRC Press, USA, 1995.**
168. STONE TW, PERKINS MN, COLLINS JF y CURRY K. Activity of the enantiomers of l-amino-5-phosphono-valeric acid stereospecific antagonists of excitatory amino acids. **Neurosci** 1981; 6: 2249-2252.
169. STRICKER-KRONGRAD A, BURLET C y BECK B. Behavioral deficits in monosodium glutamate rats: specific changes in the structure of feeding behavior. **Life Sci** 1998; 62: 2127-2132.

170. SUKHANOV SN, DE ANDRADE IS, DOLINKOFF MS y FERREIRA AT. Neonatal monosodium glutamate treatment alters rat intestinal muscle reactivity to some agonists. **European J Pharmacology** 1999; 386(2-3): 247-252.
171. SUZDAK PD, SCHWARTZ RD, SKOLNICK P Y PAUL SM. Ethanol stimulate Gamma-aminobutyric acid receptor-mediated chloride transport in rat brain. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986; 83: 4071-4075.
172. TANABE Y, NOMURA A, MASU M, SHIGEMOTO R, MIZUNO N y NAKANISHI S. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptor, mGluR3 and mGluR4. **J Neurosci** 1993; 13:1372-1378.
173. TADOKORO S, HIGUCHI Y, KURIBARA H, OKUIZUMI K. Behavioral suppression induced by oral administration of monosodium L-glutamate in rats. **Pharmacol Biochem Behav** 1974; 2: 619-625.
174. TAUKULIS HK y BRAKE LD. Therapeutic and hypothermic properties of diazepam altered by a diazepam-chlorpromazine association. **Pharmacol Biochem Behav** 1986; 34: 1-6.
175. TANG-CHRISTENSEN M, HOLST JJ, HARTMANN B y VRANG N. The arcuate nucleus is pivotal in mediating the anorectic effects of centrally administered leptin. **Neuroreport** 1999; 10: 1183-1187.
176. TANG-CHRISTENSEN M, VRANG N y LARSEN PJ. Glucagon-like peptide (7-36) amide's central inhibition of feeding and peripheral inhibition of drinking are abolished by neonatal monosodium glutamate treatment. **Diabetes** 1998; 47: 530-537.
177. TICKU MK y KULKARNI SK. Molecular interactions of ethanol with GABAergic system and potential RO15-4513 as an ethanol antagonist. **Pharmacol Biochem Behav** 1988; 30: 501-510.
178. TOKAREV D y JEZOVA D. Effect of nitric oxide inhibition on blood pressure and corticosterone response in adult rats neonatally treated with glutamate. **Physiological Research** 2000; 49: 87-94.
179. TOKUYAMA K y HIMMS-HAGEN J. Brown adipose tissue thermogenesis, and obesity of glutamate-treated mice. **Am J Physiol** 1986; 251: 407-415.
180. TREVOR AJ y WAY WL. Sedantes hipnóticos. En: Farmacología básica y clínica. (Katzung BG, Ed.), El Manual Moderno, 8ª. Ed., 2001.

181. TRENDELENBURG U, MUSKUS A, FLEMING WW y GOMEZ-ALONSO de la SIERRA B. Modification by reserpine of the action of sympathomimetic in spinal cats: a classification of sympathetic amines. **J Pharmacol** 1962; 138: 170-180.
182. TSAI G, GASTFRIEND DR y COYLE JT. The glutamatergic basis of human alcoholism. **Am J Psychiat** 1995; 152: 332-340.
183. TWYMAN RE, ROGERS CS y MACDONALD RL. Differential regulation of GABA receptors channels by diazepam and phenobarbital. **Ann Neurol** 1989; 25: 213-220.
184. VARGAS GJA. Aumento en la sensibilidad al glutamato monosódico (GMS) en ratones tratados neonatalmente con el propio GMS. **Tesis para obtener el título de Biólogo**, Facultad de Ciencias, UNAM, 1996.
185. VINCENT SL, SORENSEN I y BENES FM. Localization and high-resolution imaging of cortical neurotransmitter compartments using confocal laser scanning microscopy: GABA and glutamate interaction in rat cortex. **Res Rep** 1991; 11: 628-634.
186. WALAS I y FONUM F. The effect of parenteral glutamate treatment on the localization of neurotransmitters in the mediobasal hypothalamus. **Brain Res** 1978; 153:549-562.
187. WATKINS JC, KROGSGAAR-LASEN P y HONORE T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. **TIPS** 1990; 11: 25-33.
188. WILLETTS J, BALSTER RL y LEANDER D. The behavioral pharmacology of NMDA receptor antagonists. **TIPS** 1990; 11: 423-428.
189. WINDER DG, SMITH T y CONN PJ. Pharmacological differentiation of metabotropic receptor coupled to potentiation of cyclic adenosine monophosphate responses and phosphoinositide hidrolisis. **J Pharmacol Exp Ther** 1993; 266: 796-803.
190. WINN P, STONE TW, LATINIER M, HASTINGS MH. y CLARK AJ M. A comparison of excitotoxic lesions of the basal forebrain by kainate, ibotenate, quinolinate, N-methyl-D-aspartate or quisqualate, and the effects on toxicity of 2-amino-5-phosphovaleric acid and kynurenico acid in the rat. **Br J Pharmacol** 1991; 102: 904-908.

191. WISDEN W y SEEBURG PH. Mammalian ionotropic glutamate receptors. **Curr Opin Neurobiol** 1993; 3: 291-298.
192. WOODS JH, KATZ JL y WINGER G. Benzodiazepines: Use, abuse and consequences. **Pharmacol Rev** 1992; 44: 151-347.
193. WONG ML, SMITH MA, LICINIO J, DOI SQ, WEISS SB, POST RM y GOLD PW. Differential effects of kindled and electrically induced seizures on a glutamate receptor (GLUR1) gene expression. **Epilepsy Res** 1993; 14: 221-227.
194. YAKSH TL. Future advances in pain pharmacology: what does the present say about the future? **Proc West Pharmacol Soc** 2002; 45: 211-218.
195. YOUNG E, OLNEY J y AKIL H. Selective alterations of opiate receptor subtypes in monosodium glutamate-treated rats. **J Neurochem** 1983; 40:1558-1564.
196. YOUNG RSK, PETROFF OAC, AQUILA WJ y YATES J. Effects of glutamate, quisqualate, and N-methyl-D-aspartate in neonatal brain. **Exp Neurol** 1991; 111: 362-368.
197. ZACZEK R, NELSON M y COYLE JT. Kainic acid neurotoxicity and seizures. **Neuropharmacology** 1981; 20: 183-189.
198. ZACZEK R y COYLE JT. Excitatory amino acid analogues: neurotoxicity and seizures. **Neuropharmacology** 1982; 21: 15-26.
199. ZECCA L, ZAMBOTTI F, ZONTA N y MANTEGAZZA P. Determination of γ -aminobutyric acid areas by high-performance liquid chromatography of dansyl derivatives with ultraviolet detection. **J Chromatogr** 1982; 233: 307-312.
200. ZEEVALK GD y NICKLAS WJ. Chemically induced hypoglycemia and anoxia:relationships to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. **J Pharmacol Exp Ther** 1990; 253: 1285 -1292.
201. ZELENA D, JEZOVA D, ACS Z y MAKARA GB. Monosodium glutamate lesions inhibit the N-methyl-D-aspartate-induced growth hormone but not prolactin release in rat. **Life Sci** 1998; 62: 2065-2072.
202. ZHANG J, VALATX JL, JOUVENT M. Effects of hypophysectomy on the sleep of neonatally monosodium glutamate-treated rats. **Brain Res** 1988; 21: 897-903.

203. ZHANG D, PAN ZH, AWOBULUYI M y LIPTON SA. Structure and function of GABA_A receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. **TIPS** 2001; 22: 121-131.
204. ZHU H y BARR GA. Opiate withdrawal during development: are NMDA receptors indispensable ?. **TIPS** 2001; 22: 404-408.
205. ZIVIN JA y CHOI DW. Stroke therapy. **Scientific American** 1991; 36-43.
206. ZORUMSKY CF e ISENBERG KE. Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors. Ion channels and psychiatry. **Am J Psychiatry** 1991; 148: 162-173.

Neonatal Monosodium Glutamate Increases Ethanol Susceptibility Effects in Adult Mice

ALFONSO EFRAIN CAMPOS-SEPULVEDA^{1*}, FRUCTUOSO AYALA-GUERRERO², CONSUELO RUBIO-POO³
& RUBEN ROMAN-RAMOS⁴

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, PDCB-UAM, ²Facultad de Psicología & ³ENEP-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México; ⁴Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
*e-mail: casam@servidor.unam.mx

Glutamate (GLU) is the main fast excitatory neurotransmitter in the mammalian brain. This amino acid participates in the neurotransmission of various CNS areas [1-3] in important physiological processes such as learning [4-6] and the development of synaptic plasticity, described initially at the hippocampus level [7-10], and in other neurophysiologic events. It is also the precursor of GABA, the main inhibitory neurotransmitter in the CNS.

In spite of its function as an excitatory neurotransmitter, exogenous administration of high doses of GLU, or of monosodium glutamate (MSG) or other agonists, induces neurotoxicity in several regions of the brain. MSG is used as a food additive and seasoning agent [13]. However, MSG neurotoxicity has been demonstrated in a number of species, including mice, rats, chicks, guinea pig, hamsters and monkeys [11-16].

GLU acts on three subtypes of receptor directly linked to channels permeable to cations (NMDA and non-NMDA-receptors). Various glutamate receptors also act on a family of G-protein-coupled receptors (metabotropic receptors) [7,17-23].

Considerable evidence indicates that the neurotoxicity induced by this excitatory amino acid during the neonatal period of rodents is manifested as neurochemical, endocrine, metabolic and behavioral dysfunction producing obesity and sterility [13,14,16,17]. However, there is little information on the changes in susceptibility to drugs known to interact with the neurotransmitter systems affected by MSG neurotoxicity.

The aim of the present study was to investigate if MSG-induced neurotoxicity during the neonatal period of mice modifies susceptibility to the acute and chronic effects of ethanol in these mice when they are adult.

METHODS: Female adult mice, 25-30 g, from our own breeding facilities (CFW, initially obtained from Taconic Farms, Germantown, NY) were mated with male mice of the same strain, in a proportion of 5:1, and maintained in a temperature-controlled room (22 ± 1°C, relative humidity 55 ± 3%) with an automatic regimen of light-darkness of 12 x 12 h. Food (Purina Chow, St. Louis, MO) and water supplied *ad libitum*.

To induce neurotoxicity, on the day of delivery, pups were randomly divided in two groups: I (MSG-treatment) and II (control saline solution injection).

Pups of group I received one dose of 2 mg/g sc MSG (Sigma Chemical) on the 2nd and 4th postnatal days and 4 mg/g sc MSG on the 6th, 8th and 10th postnatal day [14-16] dissolved in 0.01 ml/g of distilled water. Group II was injected with the equivalent volume of saline solution. After weaning, mice were sexed and weighed weekly. Six months after MSG or saline treatment, dose-response curves were composed with the hypothermic, hypnotic and lethal effect of ethanol at four levels of dose (2.0, 2.6, 3.0 and 3.5 g/kg, ip) acutely administered. Rectal temperature (YSI tele-thermometer) was measured before (baseline) and 30, 60 and 120 min after ethanol administration. Duration of the hypnotic effect of ethanol (considered from the moment of the loss of the straightening reflex, until its recovery) was recorded and deaths were noted continuously for the first 4 h, and thereafter every 24 h, during 8 days. Another two groups of MSG or control male mice (n of 20 per group) were treated chronically with ethanol (2.5 g/kg, po), daily, between 13:00 and 15:00 h, for 30 days. The rodents were weighed daily (Ohaus, Galaxy 1200) and rectal temperature was measured before (baseline) and 30, 60 and 120 min after ethanol administration.

Results were analyzed with Student's t and Chi-square test. Statistical significance was set at p<0.05.

The ED₅₀ and LD₅₀ and 95% confidence limits were calculated by the Litchfield & Wilcoxon method [24].



Figure 1. Influence of neonatal MSG or saline treatment on anatomical characteristics of mice. Experimental animals weighed an average body weight of 55 g compared to 43 g for the controls.

RESULTS & DISCUSSION: Mice treated neonatally with MSG showed the anatomical and behavioral characteristics reported by various authors, such as obesity, body length shortening, shortening of the tail, and cryptorchidism (Figure 1), as a consequence of endocrine alterations.

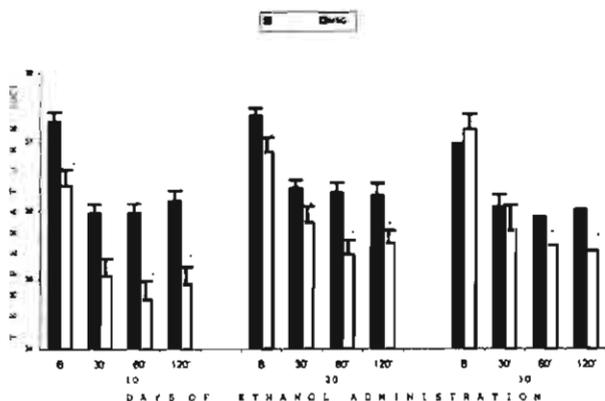


Figure 2. Dose-response curve to the hypothermic effect induced by ethanol (acute administration) in neonatal MSG or saline pretreated mice. Results are expressed as average of rectal temperature SE. Each point $n = 10$ mice. * $p < 0.05$.

Table 1. Values of ED_{50} and LD_{50} of acutely administered ethanol. In parenthesis 95% confidence limits [24]

Groups	ED_{50} (g/kg ip)	LD_{50} (g/kg ip)
Control	5.04 (3.56 - 7.14)	3.5
MSG	2.41 (2.16 - 2.69)	2.67 (2.32 - 3.09)

Acute MSG administration significantly ($p < 0.05$) increased susceptibility to the hypothermic (Fig. 2), hypnotic and lethal (Table 1) effects of ethanol with respect to the control group. The hypnotic ED_{50} was 2.41 and 5.04 g/kg for the MSG and the control group, respectively (Table 1). The LD_{50} for the group treated with MSG was of 2.67 g/kg, while the LD_{50} for the control group was 3.5 g/kg (Table 1).

Susceptibility to the chronic administration (30 days) of ethanol (2.5 g/kg, po) differed between the MSG-treated and control animals for the above-mentioned variables. Figures 3 and 4 show that neurointoxicated mice were significantly ($p < 0.05$) more vulnerable to the hypothermic and lethal effects of ethanol compared with control mice. The analysis of the temporal evolution of body weight during the thirty days of treatment with alcohol showed the MSG group had a drastic loss of body weight during the experimental period (Figure 5) while the control group showed modest initial loss during the first five to six days, and maintained its weight throughout the rest of the chronic treatment with ethanol. The few MSG-treated animals that survived the 30-day treatment with ethanol weighed on average less than 26 g, indicating a loss of more than 50% of the initial body weight. The average body weight of the experimental animals was 55 g at the beginning of chronic treatment with alcohol and 43 g for the control group, a highly significant difference ($p < 0.001$).

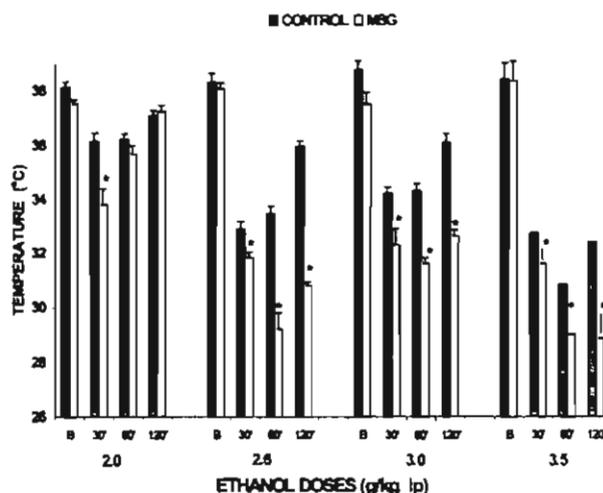


Figure 3. Influence of neonatal MSG or saline treatment upon the hypothermic effect induced by chronic ethanol (2.5 g/kg, po) administration (one dose every 24 h, during 30 days). $n = 20$ mice per group. * $p < 0.05$.

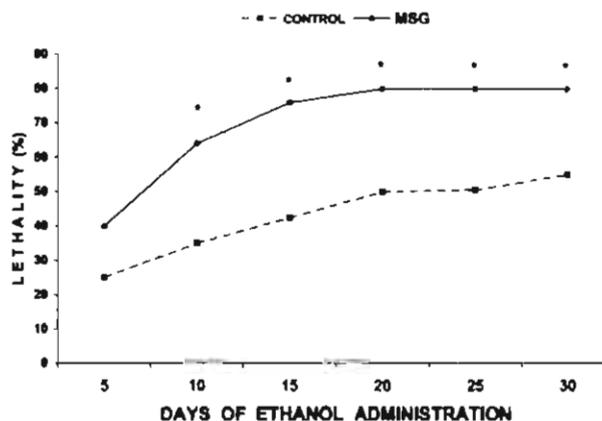


Figure 4. Effect of neonatal MSG or saline treatment on lethality accumulated by ethanol (2.5 g/kg, po) induction. Ethanol was administered every 24 h, during 30 days. $n = 20$ mice per group. * $p < 0.05$.

In another group of mice (20 MSG-treated and 20 controls) a highly significant difference ($p < 0.001$) was found between the body weight of neurointoxicated mice (51.4 ± 4.5 g) and the control group (42.0 ± 4.8 g). The comparison of the average brain weight obtained by the Glowinsky & Iversen technique [25] from both groups of animals showed significantly ($p < 0.001$) lower weight for the MSG treated group compared with the control group (390 ± 20 mg vs. 447 ± 23 mg, for the MSG-treated and the control group, respectively).

Under the experimental conditions of the present study, parenteral administration of MSG during the neonatal period of mice induced neurotoxicity (Figure 1). Rodents neurointoxicated with MSG were obviously obese, differing from the appearance and the body weight of control animals. This was not due to hyperphagia. On the con-

trary, neurointoxicated animals consume significantly less food than control animals. The doses of MSG employed in the present study have been reported to induce the destruction of 80 to 90% of the neurons of the arcuate nuclei, the median eminence and periventricular areas of the hypothalamus [12,14,15]. This damage is accepted to be responsible for the series of neurochemical, endocrine, metabolic and behavioral alterations shown by MSG neurointoxicated mice, including the increased metabolic efficiency that leads to obesity despite hypophagia.

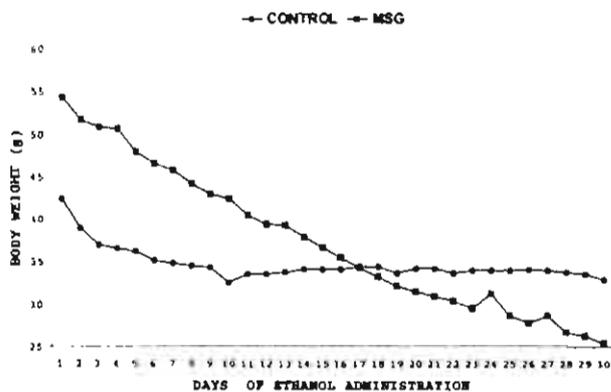


Figure 5. Influence of neonatal MSG or saline treatment upon temporal modifications of body weight induced by chronic ethanol (2.5 g/kg, po) administration (one dose daily, during 30 days). n= 20 mice per group.

The results of the present study indicate important changes in the susceptibility of the neonatally MSG neurointoxicated animals to the acute and chronic effects of ethanol, compared to the susceptibility shown by animals of the control group.

The greater susceptibility exhibited by neurointoxicated animals compared to control animals possibly depends on pharmacodynamic modifications, as it is known that MSG neurotoxicity reduces the activity of glutamic acid decarboxylase (GAD) in some areas of the CNS and, consequently, the content of GABA. Under these conditions, the reduction of the brain content of the inhibitory neurotransmitter would cause an increase in the number of GABA receptors (up-regulation), a phenomenon of neuronal plasticity that increases facilitation of GABAergic inhibition in response to ethanol [26]. The suggestion that the greater susceptibility to ethanol in the MSG-neurointoxicated animals is a consequence of a decrease in GABAergic neurotransmission [14, 27-29] is supported in the present study by the decrease in cerebral content of GABA shown by MSG-neurointoxicated animals ($233 \pm 33 \mu\text{g/g}$), compared to the cerebral content of the inhibitory neurotransmitter present in animals of the control group ($298 \pm 55 \mu\text{g/g}$).

On the other hand, the present study does not preclude the possibility that differences in ethanol susceptibility might be related to pharmacokinetic modifications of ethanol induced by MSG-treatment. Related to the foregoing is the fact that the fat content of MSG-neurointoxicated animals is ostensibly greater compared to control animals, and that the size of the brain is significantly smaller in MSG-treated mice compared with the cerebral weight of control animals.

In conclusion, the present results suggest that the neurotoxicity provoked by MSG administration during the neonatal stage induces permanent alterations in rodents that, in the adult age, increase susceptibility of the depressor effect of ethanol. This may occur as a consequence of changes in neural excitability or might be related to pharmacokinetic modifications.

ACKNOWLEDGEMENTS: We thank Mr. Antonio Vidal Caracheo for his excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Curtis DR & Watkins JC: *J Neurochem* 6: 117 (1960).
2. Collingridge GL & Lester RAJ: *Pharmacol Rev* 41: 143 (1989).
3. Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G & Knopfel T: *TINS* 19: 267 (1996).
4. Bliss TVP & Collingridge GL: *Nature* 361: 31 (1993).
5. Staubli U, Rogers G & Lynch G: *Proc Natl Acad Sci* 91: 777 (1994).
6. McGaugh JL & Izquierdo I: *TIPS* 21: 208 (2000).
7. Collingridge GL & Singer W: *TIPS* 11: 290 (1990).
8. Bortolotto ZA & Collingridge GL: *Neuropharmacol* 32: 1 (1993).
9. Arai A & Lynch G: *Brain Res* 598: 173 (1992).
10. Bashir ZI, Bortolotto ZA, Davies CH, Berreta N, Irving AJ, Seal AJ, Henley JM, Jane DE, Watkins JC & Collingridge GL: *Nature* 363: 347 (1993).
11. Lucas DR & Newhouse JP: *AMA Arch Ophthalmol* 58: 193 (1957).
12. Olney JW: *Science* 164: 717 (1969).
13. Kizer JS, Nemeroff CHB & Youngblood WW: *Pharmacol Rev* 29: 301 (1978).
14. Meister B, Ceccatelli S, Hokfelt T, Anden NE, Andén M & Theodorsson E: *Exp Brain Res* 76: 343 (1989).
15. Meister B: *Methods in Neurosciences USA*, Acad Press, vol 7 (1991).
16. Chambille I & Serviere J: *J Comp Neurol* 338: 67 (1993).
17. Olney JW: *Biol Psychiatry* 26: 505 (1989).
18. Mody I & McDonald JF: *TIPS* 16: 356 (1995).
19. Danysz W, Parsons CG, Bresink I & Quack G: *Drug News Perspect* 8: 261 (1995).
20. Schoepp DD & Conn PJ: *TIPS* 14: 13 (1993).
21. Wisden W & Seeburg PH: *Curr Opin Neurobiol* 3: 291 (1993).
22. Dingledine R, Borges K, Bowie D & Traynelis S: *Pharmacol Rev* 51: 8 (1999).
23. Alexander SPH, Mathie A & Peters JA: *TIPS Twelfth ed.* 1 (2001).
24. Litchfield JT & Wilcoxon F: *J Pharmacol Exp Ther* 96: 99 (1949).
25. Glowinsky J & Iversen LL: *J Neurochem* 13: 655 (1966).
26. Suzdak PD, Schwartz RD, Skolnick P & Paul SM: *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4071 (1986).
27. Beas ZC, Sanchez RMY, Ureña GME & Feria VA: *Neurochem Internac* 33: 217 (1998).
28. Jennes L, Stump WE, Bissette G & Nemeroff CB: *Brain Res* 308: 245 (1984).
29. Di Giorgio RM, De Luca GC, Garofalo MP, Conti C & Lentile R: *Italian J Biochem* 34: 19 (1985).