

---

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias*

---

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**"DENSIDAD DE CÉLULAS GABAérgicas, ACTIVIDAD Y PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA DESCARBOXILASA DEL ÁCIDO GLUTÁMICO (GAD; EC 4.1.1.15) EN DIFERENTES REGIONES DEL CEREBRO DE LA RATA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON GLUTAMATO MONOSÓDICO (GMS)"**

---

---

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ÁREA NEUROBIOLOGÍA**  
P R E S E N T A  
**MÓNICA ELISA UREÑA GUERRERO**  
GUADALAJARA, JALISCO. 1999.

---

---

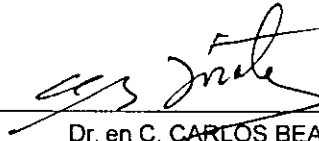
**DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS**  
**COORDINADOR GENERAL DEL POSGRADO**  
**EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, C.U.C.B.A., U. de G.**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto, nos dirigimos a Usted para informarle que después de revisar el trabajo de tesis "*Densidad de células GABAérgicas, actividad y propiedades cinéticas de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC 4.1.1.15) en diferentes regiones del cerebro de la rata después del tratamiento neonatal con glutamato monosódico (GMS)*" realizado por la *Biól. Monica Elisa Ureña Guerrero* aspirante al grado de Maestro en Ciencias Biológicas (Area Neurobiología), consideramos que ha quedado debidamente concluido. Por lo que, autorizamos su impresión y programación de fecha para el examen de grado correspondiente.

Agradeciendo de antemano las atenciones prestadas a la presente quedamos de Usted, aprovechando la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

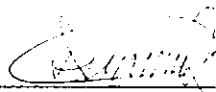
Las Agujas, Nextipac, Zapopán, Jal. a 04 de Junio de 1999.



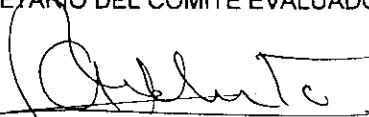
Dr. en C. CARLOS BEAS ZARATE  
DIRECTOR DE TESIS Y  
TERCER VOCAL DEL COMITE EVALUADOR



Dr. en C. JUDITH MARCELA DUEÑAS JIMENEZ  
PRESIDENTE DEL COMITE EVALUADOR



Dr. en C. SONIA LUQUIN DE ANDA  
SECRETARIO DEL COMITE EVALUADOR



Dr. en C. ALBERTO MORALES VILLAGRAN  
PRIMER VOCAL DEL COMITE EVALUADOR



M. en C. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA  
SEGUNDO VOCAL DEL COMITE EVALUADOR

Este trabajo se realizó dentro del Laboratorio de Neuroquímica de la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, CIBO-IMSS, bajo la dirección del Dr. en Cs. Carlos Beas Zárate.

El presente trabajo está dedicado muy especialmente al interés, el cariño y el deseo de superación que siempre observé en la conducta de Ma. del Rosario Guerrero Morales, quien como mi madre, me mostró el camino para seguir superándome.

Gracias, a ti mamá, donde quiera que estés.

Gracias a mi familia, que ha tenido que aprender a convivir con mi trabajo, aunque a veces no entienda lo que hago, ni el porqué me he dedicado a la investigación pudiendo hacer otras cosas.

Gracias a Veronica, Mayra, Consuelo, Lizbeth, Gricelda, Leticia Ramírez y Leticia Ontiveros por permitirme compartir con ustedes una parte de mi vida.

Gracias a Alma Rosa del Angel, Carlos Beas, Alberto Morales y Daniel Ortuño, por confirmarme todos los días que son mis amigos.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio de Neurobiología del C.U.C.B.A., que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, en particular, al Dr. en Cs. Daniel Ortuño Sahagún y a la M. en C. Martha Catalina Rivera Cervantes, por dedicar una parte de su tiempo a la revisión de este trabajo.

Gracias a todas la personas que han colaborado en la realización de este trabajo, brindándome su apoyo incondicional. Especialmente, al Dr. en Cs. Carlos Beas Zárate, por su dirección en la realización de este trabajo; y a los profesores Dr. en Cs. Alberto Morales Villagrán, M. en C. Laura Medina Ceja, Dr. en Cs. Ma. Sonia Luquín de Anda y Dr. en Cs. Judith Marcela Dueñas Ramírez, por elevar la calidad de este trabajo, gracias.

# INDICE

---

<i>CONTENIDO</i>	<i>PAG.</i>
Glosario de Figuras	i
Glosario de Tablas	iii
Lista de Abreviaturas	iv
Resumen	vi
Abstract	viii
Introducción	1
Antecedentes	17
Planteamiento del Problema	33
Hipótesis	34
Objetivos	35
Materiales y Métodos	36
Diagrama Experimental	45
Resultados	46
Discusión	67
Conclusiones	73
Bibliografía	74

## GLOSARIO DE FIGURAS

---

<b>FIGURA 1.</b> Síntesis de GABA a partir de Glu por activación de la GAD y Tabla Comparativa de las Características Generales de la GAD <sub>65</sub> y la GAD <sub>67</sub> . . . . .	09
<b>FIGURA 2.</b> Sinapsis GABAérgica. . . . .	10
<b>FIGURA 3.</b> Receptor GABA <sub>A</sub> . . . . .	11
<b>FIGURA 4.</b> Receptor GABA <sub>B</sub> . . . . .	12
<b>FIGURA 5.</b> Vías de neurotransmisión glutamatérgica . . . . .	18
<b>FIGURA 6.</b> Sinapsis glutamatérgica . . . . .	20
<b>FIGURA 7.</b> Receptores glutamatérgicos. . . . .	24
<b>FIGURA 8.</b> Configuración transmembranal de las subunidades proteicas que componen a los receptores ionotrópicos glutamatérgicos. . . . .	25
<b>FIGURA 9.</b> Mecanismos celulares implicados en el establecimiento de las crisis convulsivas y las enfermedades neurodegenerativas. . . . .	30
<b>FIGURA 10.</b> Mecanismos celulares implicados en la excitotoxicidad generada por la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos . . . . .	31
<b>FIGURA 11.</b> Cortes corónales de la corteza cerebral y el estriado de la rata. . . .	41
<b>FIGURA 12.</b> Histoarquitectura típica de la corteza cerebral . . . . .	42
<b>FIGURA 13.</b> Cortes corónales del hipocampo de la rata . . . . .	43
<b>FIGURA 14.</b> Actividad de la GAD durante el desarrollo posnatal de la corteza cerebral de la rata. . . . .	49
<b>FIGURA 15.</b> Células GABAérgicas de la corteza cerebral externa . . . . .	51
<b>FIGURA 16.</b> Células GABAérgicas de la corteza cerebral interna . . . . .	52
<b>FIGURA 17.</b> Densidad de células GABAérgicas corticales en el cerebro de ratas adultas . . . . .	53

<b>FIGURA 18.</b> Imágenes comparativas de las células GABAérgicas corticales de ratas adultas intactas (A), tratadas neonatalmente con NaCl (B) y con GMS (C) . . . . .	54
<b>FIGURA 19.</b> Actividad de la GAD durante el desarrollo posnatal del estriado de la rata . . . . .	55
<b>FIGURA 20.</b> Células GABAérgicas estriatales. . . . .	57
<b>FIGURA 21.</b> Células GABAérgicas estriatales. . . . .	58
<b>FIGURA 22.</b> Densidad de células GABAérgicas estriatales en el cerebro de ratas adultas. . . . .	59
<b>FIGURA 23.</b> Imágenes comparativas de las células GABAérgicas estriatales de ratas adultas intactas (A), tratadas neonatalmente con NaCl (B) y con GMS (C) . . . . .	60
<b>FIGURA 24.</b> Actividad de la GAD durante el desarrollo posnatal del hipocampo de la rata . . . . .	61
<b>FIGURA 25.</b> Células GABAérgicas hipocampales. . . . .	63
<b>FIGURA 26.</b> Imágenes individuales de las células GABAérgicas del hipocampo. . . . .	64
<b>FIGURA 27.</b> Densidad de células GABAérgicas hipocampales en el cerebro de ratas adultas . . . . .	65
<b>FIGURA 28.</b> Imágenes comparativas de las células GABAérgicas hipocampales de ratas adultas intactas (A), tratadas neonatalmente con NaCl (B) y con GMS (C) . . . . .	66



## GLOSARIO DE TABLAS

---

<b>TABLA 1.</b> Interacciones entre los mecanismos bioenergéticos y excitotóxicos . . .	32
<b>TABLA 2.</b> Propiedades cinéticas de la GAD durante el desarrollo posnatal de la corteza cerebral de la rata. . . . .	50
<b>TABLA 3.</b> Propiedades cinéticas de la GAD durante el desarrollo posnatal del estriado de la rata . . . . .	56
<b>TABLA 4.</b> Propiedades cinéticas de la GAD durante el desarrollo posnatal del hipocampo de la rata. . . . .	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

$\alpha$	Alfa
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosín difosfato
AP	Eje anteroposterior
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
Asn	Asparragina
Asp	Acido Aspártico o Aspartato
ATP	Adenosín trifosfato
$\beta$	Beta
BSA	Albúmina de suero de bovino
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado
CA1-3	Campos de Ammon del hipocampo
CB	Amortiguador de citratos de sodio
$[^{14}\text{C}]\text{O}_2$	Dióxido de carbono radiactivo con carbono catorce
$[^{14}\text{C}]\text{-Glu}$	Acido glutámico radiactivo con carbono catorce
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
$\text{Ca}^{++}$	Ión Calcio
$\text{Cl}^-$	Ión Cloro
$\delta$	Delta
DAB	Diaminobencidina
DAG	Diacilglicerol
EAAT1-5	Transportadores plasmáticos para glutamato
$\gamma$	Gamma
GABA	Acido $\gamma$ -aminobutírico
GABA-T	Transaminasa del GABA
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
$\text{GAD}_{65}$	ApoGAD
$\text{GAD}_{67}$	HoloGAD
GAD1	Gen codificante para $\text{GAD}_{67}$
GAD2	Gen codificante para $\text{GAD}_{65}$
GAD6	Anticuerpo monoclonal para $\text{GAD}_{65}$
GAT1-3	Transportadores plasmáticos para GABA
GD	Giro dentado
Gln	Glutamina
Glu	Acido Glutámico o Glutamato
GMS	Glutamato monosódico
GluR1-4	Subunidades del receptor para AMPA
GluR5-7	Subunidades del receptor para ácido kaínico
$\text{H}^+$	Ión Hidrógeno
$[^3\text{H}]\text{-Glu}$	Acido glutámico tritiado

[ <sup>3</sup> H]-KA	Acido kaínico tritiado
His	Histidina
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acido Sulfúrico
IgG	Inmunoglobulina G
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
K <sup>+</sup>	Ión Potasio
K2	Antisuero para GAD
KA1-2	Proteínas de unión de alta afinidad para el ácido kaínico
Km	Constante de Michaelis-Menten
L	Eje lateral
Lys	Lisina
M1-4	Dominios transmembranales de las subunidades de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos
Mg <sup>++</sup>	Ión Magnesio
mGluR1-8	Receptores metabotrópicos para Glu
MK801	Dizocilpina (bloqueador del canal del receptor para N-Metil-D-Aspartato)
Na <sup>+</sup>	Ión Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Radical Amonio
NR1A-H,2A-D	Subunidades del receptor para N-Metil-D-Aspartato
PB	Amortiguador de fosfatos de sodio
PBS	Amortiguador salino de fosfatos de sodio
PLP	Fosfato de piridoxal
Pro	Prolina
ρ	Rho
R-AMPA	Receptor glutamatérgico sensible a Acido propiónico-3-amino-4- hidroxí-5-metil-isoxasol
R-GABA <sub>A</sub>	Receptor para GABA tipo A
R-GABA <sub>B</sub>	Receptor para GABA tipo B
R-GABA <sub>C</sub>	Receptor para GABA tipo C
R-Glu	Receptores glutamatérgicos
R-KA	Receptor glutamatérgico sensible a ácido kaínico
R-NMDA	Receptor glutamatérgico sensible a N-metil-D-Aspartato
SCN <sup>-</sup>	Radical tiocianuro
SN	Sistema Nervioso
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima
Zn <sup>++</sup>	Ión Zinc

## RESUMEN

---

El aumento excesivo de la concentración extracelular de glutamato (Glu) dentro del sistema nervioso induce degeneración neuronal a través de un proceso conocido como excitotoxicidad, el cual, parece estar implicado en el establecimiento y desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas. Recientemente, se ha demostrado que la administración de glutamato monosódico (GMS) a animales recién nacidos modifica la actividad de las neuronas colinérgicas en diferentes regiones cerebrales durante el desarrollo posnatal de la rata. Por otra parte, las neuronas GABAérgicas parecen ser especialmente susceptibles a los efectos excitotóxicos del Glu. En nuestro laboratorio se ha demostrado que después del tratamiento neonatal con GMS la liberación estimulada del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) a los 60 días de edad se eleva significativamente en la corteza cerebral, a diferencia del estriado y el hipocampo donde se encontró disminuida. Sin embargo, con esos resultados no fue posible establecer si las modificaciones encontradas se debían a la pérdida de células GABAérgicas. Por lo que, en el presente trabajo se determinó la actividad y propiedades cinéticas de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC 4.1.1.15) y la densidad de células GABAérgicas en la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo de la rata después del tratamiento neonatal con GMS (4mg/g de peso corporal por vía subcutánea los días 1,3,5, y 7 de edad posnatal).

Los resultados muestran que el tratamiento neonatal con GMS disminuyó la actividad de la GAD en la corteza cerebral a los 21 y 60 días de edad posnatal, cambios que se asocian con una disminución en la afinidad de la enzima por el sustrato. Además, a los 60 días de edad posnatal se observó un aumento en la actividad de la GAD en el estriado y en el hipocampo, asociado con una elevación en la  $V_{max}$  para ambas regiones y en la afinidad para el estriado. Por otro lado, el tratamiento neonatal con GMS redujo significativamente la densidad de células GABAérgicas en las tres regiones, respecto a ambos grupos testigo. Lo que sugiere

que el tratamiento neonatal con GMS produce degeneración de células GABAérgicas en todas las regiones estudiadas. Estas alteraciones pueden conducir a problemas en el control de la excitabilidad neuronal, favoreciendo el desarrollo de crisis convulsivas o de padecimientos neurodegenerativos.

## ABSTRACT

---

High extracellular concentrations of glutamate (Glu) in nervous system induces neuronal degeneration through a process known as excitotoxicity, which may lead to degenerative disorders establishment. Recently, it has been demonstrated that neonatal treatment with monosodium glutamate (MSG) modify the activity of cholinergic neurons from different cerebral regions during posnatal development. In addition, our laboratory have showed an increase of  $\gamma$ -aminobutyric acid stimulated release in cerebral cortex, whereas in striatum and hippocampus the same parameter was reduced in adult rats treated neonatally with MSG. However, those results did not permit us know if the modifications were directly associated with cellular death of GABAergic neurons. Therefore, the purpose of the present work was to evaluate the effects of MSG neonatal treatment (4mg/g body weight, s.c., at 1, 3, 5 and 7 days old) on the activity and kinetics of the glutamic acid decarboxylase enzyme (GAD; EC 4.1.1.15) as well as on the GABAergic cell density in the rat cerebral cortex, striatum and hippocampus.

Experimental data showed that the neonatal treatment with MSG decreased the GAD activity in cerebral cortex on the posnatal days 21 and 60, these changes were associated with a reduction in the enzyme affinity. On the other hand, in striatum and hippocampus, the GAD activity was increased on posnatal day 60, which was related first with an increase of the  $V_{max}$  for both regions and second with an increase in the enzyme affinity for the striatum. Furthermore, the GABAergic cell density diminished significantly in all three regions after MSG treatment. These results suggest that GABAergic neurons die as a consequence of the excitotoxicity generated by Glu in immature brain, therefore the control of neuronal excitability may be reduced, which could elicit to seizures occurrence or lead to development of neurodegenerative disorders.

# INTRODUCCION

---

## GENERALIDADES

El sistema nervioso (SN) es un conjunto de estructuras funcionalmente especializadas, mediante las cuales el organismo responde a los estímulos que recibe, tanto del medio externo (extrínsecos) como del interno (intrínsecos). Se divide en: **a) sistema nervioso central (SNC)**: representa el nivel integrativo y comprende el encéfalo y la médula espinal; **b) sistema nervioso periférico (SNP)**: comprende las prolongaciones neuronales aferentes y eferentes de los nervios craneales y espinales; y constituye el nivel de aferentación y eferentación nerviosas; y **c) sistema nervioso autónomo (SNA)** o neurovegetativo: comprende elementos tanto del SNC como del SNP; se subdivide en parasimpático y simpático; e interviene en la regulación de la actividad de las vísceras (1).

Los componentes básicos del SN son: **1) las células nerviosas (neuronas)**, **2) las células intersticiales (astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann y células satélite)** y **3) los elementos del tejido conjuntivo (fibroblastos, microglia, vasos sanguíneos y líquido extracelular)**. Las neuronas y las células intersticiales derivan del ectodermo embrionario, mientras que los elementos del tejido conjuntivo lo hacen del mesodermo (2).

La neurona constituye la unidad morfológica y ontogénica del SN. Desde el punto de vista morfológico toda neurona se encuentra en contacto (sinapsis) con las demás neuronas por medio de sus prolongaciones. Funcionalmente, cada neurona es un elemento integrador, conductor y transmisor de la información codificada por el SN. Ontogénicamente, todas las neuronas se desarrollan a partir de un tipo celular primordial llamado neuroblasto (2).

La imagen típica de una neurona comprende un cuerpo celular estrellado (soma o pericarión) con varias prolongaciones dendríticas y un axón que emerge de uno de sus polos. Sin embargo, la neurona es una célula polimórfica, cuya clasificación no

sólo se basa en la forma sino también en otras características, tales como sus propiedades electrofisiológicas (3).

La transmisión de impulsos nerviosos de neurona a neurona se lleva a cabo en la sinapsis, donde generalmente las terminales del axón de una neurona (presináptica) hacen contacto con el soma o las dendritas de otra (postsináptica), sin embargo, el contacto sináptico puede implicar otras partes de la célula nerviosa. En las sinapsis químicas, los potenciales de acción en la neurona presináptica provocan la liberación de sustancias neurotransmisoras o neuromoduladoras desde las vesículas sinápticas hacia el espacio intersináptico (hendidura sináptica), lo que produce cambios en el potencial de membrana de la célula postsináptica (4). Así, las neuronas pueden clasificarse por la sustancia química que utilizan preferentemente como neurotransmisor, de tal forma que aquéllas que emplean acetilcolina son colinérgicas, las que usan glutamato son glutamatérgicas, las que emplean ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) son GABAérgicas, etc.

Cualquier alteración en los mecanismos básicos de la transmisión nerviosa o en la densidad y tipo de las sinapsis, puede conducir al establecimiento de diversas neuropatologías, tales como las enfermedades neurodegenerativas y la epilepsia, padecimientos que se han asociado con modificaciones tanto en la neurotransmisión GABAérgica como en la glutamatérgica.

### ***NEUROTRANSMISION GABAérgica***

En la década de 1920, se demostró la naturaleza química de las señales implicadas en la comunicación interneuronal. A partir de entonces, se ha tratado de identificar a las sustancias químicas neurotransmisoras, así como su localización específica dentro del SN. Actualmente, se considera que de acuerdo con su naturaleza química existen por lo menos tres tipos de neurotransmisores: aminoácidos, aminas biogénicas y péptidos. Además, los diferentes aminoácidos neuroactivos suelen clasificarse según su efecto en excitadores (ácido glutámico,



ácido aspártico, ácido cistéico y ácido cisteín-sulfónico) e inhibidores (ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glicina,  $\beta$ -alanina y taurina) (5).

Dentro de los aminoácidos inhibidores, el GABA, se encuentra en concentraciones altas dentro del cerebro, mientras que en otros tejidos es más bien escaso (6). El GABA se distribuye prácticamente en todas las regiones del SNC y ejerce un control casi total sobre la excitabilidad neuronal, condiciones que lo definen actualmente como el principal neurotransmisor inhibitor del SNC de mamíferos (7).

Las neuronas GABAérgicas son morfológicamente muy variadas (estrelladas, piriformes, en canasta, etc.) (8), por lo que deben diferenciarse a través del estudio de sus aferencias sinápticas, o bien, por el contenido de neuropéptidos o de proteínas citoplásmicas que unen calcio (por ejemplo, calcineurina o calbindina) (9). Además, las células GABAérgicas establecen prácticamente todos los tipos de sinapsis descritos (axosomáticas, axodendríticas, axoespinosas, axoaxónicas, seriales, dendrodendríticas, recíprocas y en cinta) (8) e incluso, en algunas regiones del SN llegan a constituir más del 50% de la población neuronal (8,10).

### **Vías de neurotransmisión GABAérgica**

Aunque se distribuye ampliamente, el GABA es más abundante en algunas regiones del SNC de mamíferos, tales como los ganglios basales (estriado, globo pálido y sustancia negra), el cerebelo, el hipocampo, la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, la retina y la médula espinal (6,7).

Dentro de los ganglios basales, tanto el estriado como el globo pálido y la sustancia negra poseen interneuronas GABAérgicas. Además, existen neuronas GABAérgicas estriatales que inervan a la sustancia negra (compacta y reticulada) y al globo pálido (lateral y medial); en el globo pálido que inervan al tálamo y al subtálamo; y en la sustancia negra reticulada que se proyectan hacia el tálamo (11,12).

En el cerebelo, las células de Purkinje que proyectan a los núcleos profundos cerebelares; las células en canasta que inervan el soma de las de Purkinje; y las células de Golgi que hacen contacto con las granulosas, son GABAérgicas (8,13).

En el hipocampo, las células en canasta que inervan a las neuronas piramidales, liberan GABA, lo mismo que varias interneuronas hipocampales, corticales, retinianas, del bulbo olfatorio y de la médula espinal (6,7,8).

En todas las regiones mencionadas anteriormente, la densidad de células GABAérgicas es muy alta y se ha logrado estimar que en la corteza cerebral representan aproximadamente del 20-30%, en los ganglios basales del 25-50%, en el hipocampo del 10-20% y en el cerebelo del 20-40% de la población neuronal total (8,10).

### **Síntesis neuronal del GABA**

Dentro de las células GABAérgicas, el GABA se sintetiza fundamentalmente por acción de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC 4.1.1.15), enzima que  $\alpha$ -descarboxila al ácido glutámico en un proceso dependiente de fosfato de piridoxal (PLP) (14) (Figura 1). La GAD, no es exclusiva del SN, sin embargo, dentro de éste sólo se encuentra en las neuronas GABAérgicas (7). Por otro lado, se ha sugerido la existencia de una vía de síntesis alterna para el GABA, a partir de la putrescina y a través de la deshidrogenación del  $\gamma$ -aminobutaraldehído, sin embargo, esta síntesis no representa ni siquiera el 20% de la que realiza la GAD y se desconoce cuál sea su relación con el GABA utilizado como neurotransmisor (15).

A través del aislamiento y purificación de la GAD de diferentes especies de vertebrados, se ha logrado establecer que es un dipéptido homomérico con peso molecular aproximado de 120,000 daltones, mientras que el peso molecular de sus dos subunidades fluctúa entre 59,000-70,000 daltones (16). Así, de acuerdo con el peso molecular de las subunidades que la componen, se considera que existen por lo menos dos tipos de la GAD en el cerebro adulto, conocidas como GAD<sub>65</sub> (65,400 daltones) y GAD<sub>67</sub> (66,600 daltones) (17,18), las cuales difieren en la interacción con

el cofactor PLP (18,19), la carga (20), la antigenicidad (10,17) y la distribución neuronal (10,18), además de ser el producto de dos genes únicos e independientes (21,22) (Figura 1). Las propiedades de la interacción entre la GAD y el cofactor PLP, descritas inicialmente por Tapia y col. (1977) (23), a través de los estudios cinéticos de la enzima, sugieren la existencia de dos formas de la GAD, una PLP-dependiente (apoGAD) y otra PLP-independiente (holoGAD) (21,23). Así, aunque el cofactor PLP interactúa tanto con la GAD<sub>65</sub> como con la GAD<sub>67</sub>, se conoce que la presencia de PLP estimula la actividad enzimática de la GAD<sub>65</sub> (apoGAD) más que la de GAD<sub>67</sub> (holoGAD) (10,16,24). Esto ha llevado a proponer que la GAD<sub>65</sub> puede funcionar como un almacén inactivo para la síntesis del GABA sensible a estimulación y que puede ser más abundante en las neuronas GABAérgicas que disparan fásicamente, en comparación con aquellas que disparan tónicamente (10,23) (Figura 1).

La diferencia de carga entre las dos formas de la GAD parece determinar su interacción con las membranas celulares (21). Respecto a esto, se conoce que la GAD se encuentra en estrecha asociación con pequeñas vesículas de axones en crecimiento (25) y que su asociación con membranas depende de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (20,21). Debido a que la apo-GAD tiene una fuerte afinidad por los polianiones (26), es posible que la GAD<sub>65</sub> establezca con facilidad dichas interacciones electrostáticas, lo que determinaría su localización subcelular dentro de las terminales nerviosas (21) (Figura 1).

Los patrones de distribución neuronal para la GAD<sub>65</sub> y la GAD<sub>67</sub> se lograron establecer gracias a sus diferencias en antigenicidad, que permitieron producir anticuerpos específicos para cada una de las formas de la GAD, entre los que destacan el anticuerpo monoclonal GAD-6 y el antisuero K2 que reconocen a la GAD<sub>65</sub> y a la GAD<sub>67</sub>, respectivamente (18,27,28). Así, tanto las técnicas inmunocitoquímicas como la hibridación *in situ*, han demostrado que el contenido de la GAD<sub>65</sub> es mayor en terminales axónicas, en tanto que la GAD<sub>67</sub> es más abundante en los somas de neuronas GABAérgicas. Esto ha llevado a sugerir a diferentes autores que la GAD<sub>65</sub> está involucrada principalmente con la síntesis del GABA

neurotransmisor y la GAD<sub>67</sub> con el GABA implicado en el metabolismo de los ácidos tricarbóxicos (10,24,29) (Figura 1).

Las secuencias de aminoácidos de la GAD<sub>65</sub> y la GAD<sub>67</sub> son 65% idénticas y 80% similares entre sí y son aproximadamente 100 aminoácidos del extremo N-terminal los que constituyen la porción de mayor divergencia (21). Ambas formas de la GAD contienen la secuencia de aminoácidos Asn-Pro-His-Lys, que conforman el sitio de unión para el cofactor PLP en las diferentes descarboxilasas, tanto de vertebrados como de invertebrados (21,30). Los estudios de clonación y secuenciación de los ADNc de ambas formas de la GAD han permitido establecer que provienen de dos genes distintos no hibridables entre sí, cuya secuencia de identidad más larga se compone únicamente de 17 nucleótidos (19,31). Así, en el caso del humano, el gen que codifica para la GAD<sub>65</sub> (GAD2) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 10 (32), mientras que el gen de la GAD<sub>67</sub> (GAD1) se localiza en el cromosoma 2 (31) (Figura 1).

Además de las diferencias entre la GAD<sub>65</sub> y la GAD<sub>67</sub>, descritas anteriormente, también existen diferencias con respecto a la susceptibilidad de estas enzimas a diversos factores que regulan la síntesis del GABA. Así, la GAD<sub>65</sub> es altamente susceptible a la concentración del cofactor PLP (10,16,24) y a la concentración iónica del medio (20,26). En tanto que el incremento en la concentración intracelular del GABA reduce de manera selectiva la actividad de la GAD<sub>67</sub> (33). Por otro lado, la síntesis del GABA se reduce en concentraciones bajas de ATP (14) y la expresión de los mensajeros de la GAD se incrementa en presencia de estrógenos (34).

### **Transporte del GABA hacia las vesículas sinápticas**

Dentro de las terminales nerviosas GABAérgicas, el GABA recién sintetizado, se transporta hacia el interior de las vesículas sinápticas (Figura 2), a través de un sistema de contra-transporte H<sup>+</sup>/GABA, el cual depende directamente del gradiente electroquímico de H<sup>+</sup>, generado por una ATPasa vacuolar conocida como tipo V (35). Altas concentraciones de Cl<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> reducen el transporte del GABA hacia el

interior de las vesículas sinápticas (36). Además, el transporte vesicular del GABA se caracteriza por tener afinidad baja tanto para GABA como para Glicina (5-10 mM) (37).

### **Liberación del GABA**

Después de un estímulo despolarizante, las terminales nerviosas liberan grandes cantidades del neurotransmisor. En el caso del GABA, la mayor parte se libera a través de la exocitosis de vesículas sinápticas (Figura 2), mediante un proceso dependiente de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{++}$ . Sin embargo, el GABA (alrededor del 30%) también puede liberarse a través de un mecanismo que requiere la presencia de  $\text{Na}^+$  extracelular y que al parecer, implica la inversión de los transportadores plasmáticos neuronales de GABA, los cuales en vez de transportarlo hacia el interior de la terminal, lo transportan hacia el espacio intersináptico (38).

### **Receptores GABAérgicos**

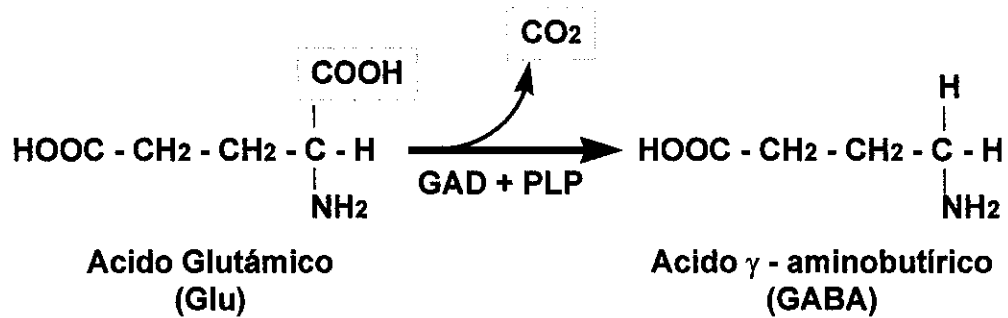
Los efectos neuronales del GABA son mediados por su interacción con receptores específicos, los cuales se han clasificado en por lo menos dos tipos, conocidos como receptores  $\text{GABA}_A$  y  $\text{GABA}_B$ . Esta clasificación se basa en la respuesta farmacológica de los receptores, de tal forma que aquellos que son sensibles al bloqueo por bicuculina se consideran  $\text{GABA}_A$ , mientras que los que no son bloqueados por bicuculina, pero se activan en presencia de baclofen se consideran  $\text{GABA}_B$  (39).

Los receptores  $\text{GABA}_A$  (R- $\text{GABA}_A$ ), son ionotrópicos, es decir, cuentan con un canal iónico acoplado a su estructura, el cual permite la entrada de  $\text{Cl}^-$  durante la activación del receptor. Además, posee múltiples sitios alostéricos de unión para diferentes drogas, tales como las benzodiazepinas, los barbitúricos, los esteroides y algunos convulsivantes y anticonvulsivantes. Estructuralmente, los R- $\text{GABA}_A$  son similares a otros receptores ionotrópicos, es decir, se componen de cinco subunidades proteicas cada una de las cuales posee cuatro dominios transmembranales. Las subunidades que componen a este receptor pueden ser de

por lo menos cinco tipos generales  $\alpha$ : con seis variedades;  $\beta$ : con cuatro variedades;  $\gamma$ : con tres variedades;  $\delta$  y  $\rho$  (40) (Figura 3). Estos receptores son postsinápticos y determinan la respuesta inhibitoria rápida al GABA en la mayoría de las regiones del SN (39). Sin embargo, se ha demostrado que la activación excesiva de los R-GABA<sub>A</sub> ubicados en las dendritas distales de las células piramidales de CA1 en el hipocampo, produce despolarización más que hiperpolarización, al parecer, a través de un mecanismo que implica el movimiento de iones bicarbonato (41). Estas observaciones han roto el esquema del GABA como el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC, sin embargo, todavía son necesarios más estudios que permitan establecer las implicaciones fisiológicas de tal despolarización. Además, tanto los astrocitos como los oligodendrocitos expresan receptores con características farmacológicas y electrofisiológicas semejantes a las del R-GABA<sub>A</sub> (42).

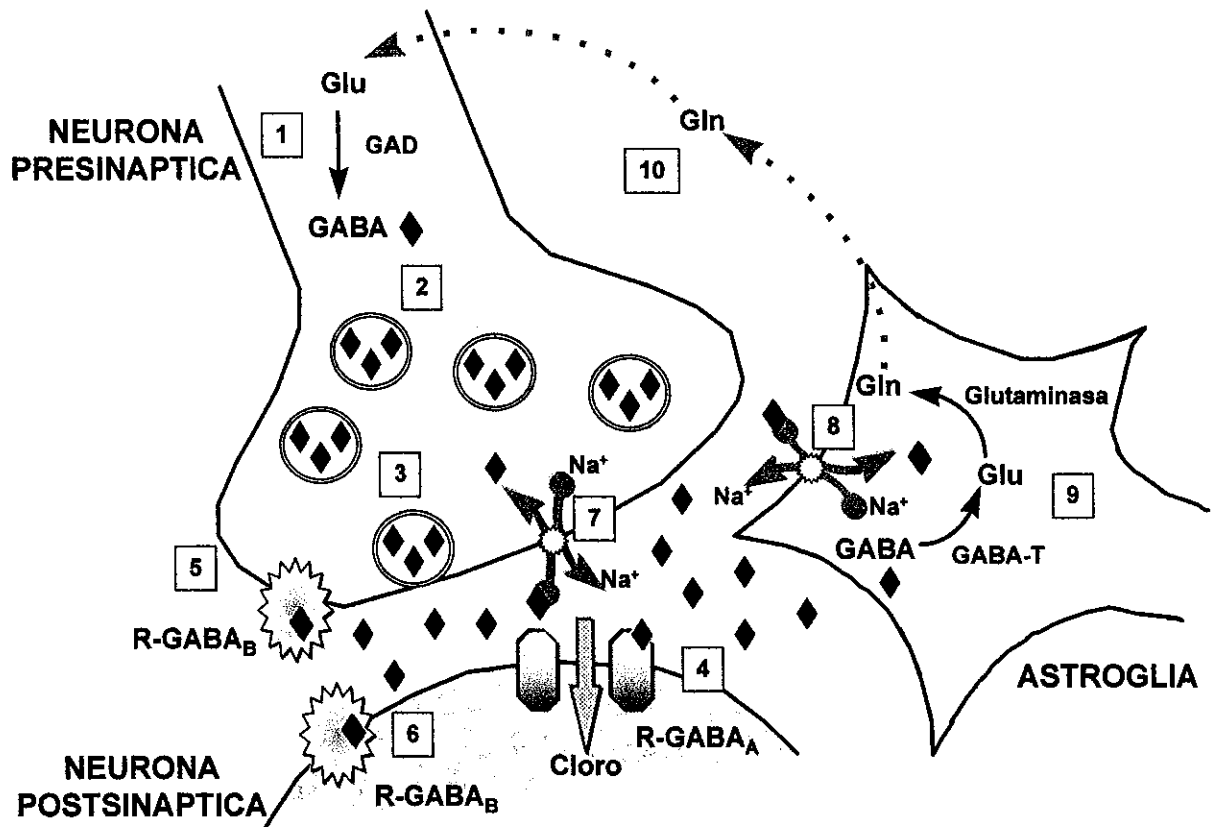
Por otro lado, el receptor GABA<sub>B</sub> (R-GABA<sub>B</sub>), es un receptor metabotrópico que interacciona con proteínas G para regular los canales dependientes de voltaje para Ca<sup>++</sup> y K<sup>+</sup>. La unión del GABA con el R-GABA<sub>B</sub> promueve la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, enzima que genera ácido araquidónico, el cual activa a la proteína cinasa C, que al fosforilar los canales promueve la salida de iones K<sup>+</sup>, al mismo tiempo que inhibe la entrada de iones Ca<sup>++</sup>, de forma tal que favorece la repolarización neuronal y reduce la duración de los potenciales de acción, condiciones que disminuyen la liberación de neurotransmisores (39) (Figura 4). Los R-GABA<sub>B</sub> se encuentran tanto a nivel presináptico como postsináptico y están implicados en la modulación de la actividad de otros receptores incluyendo a los R-GABA<sub>A</sub> (43) (Figura 2).

Además, se ha sugerido la existencia de un tercer tipo de receptor para GABA, conocido como receptor GABA<sub>C</sub> (R-GABA<sub>C</sub>), el cual posee características farmacológicas diferentes a las de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>, sin embargo, es posible que este receptor sea una variante de ensamble poco común de los R-GABA<sub>A</sub> (43).



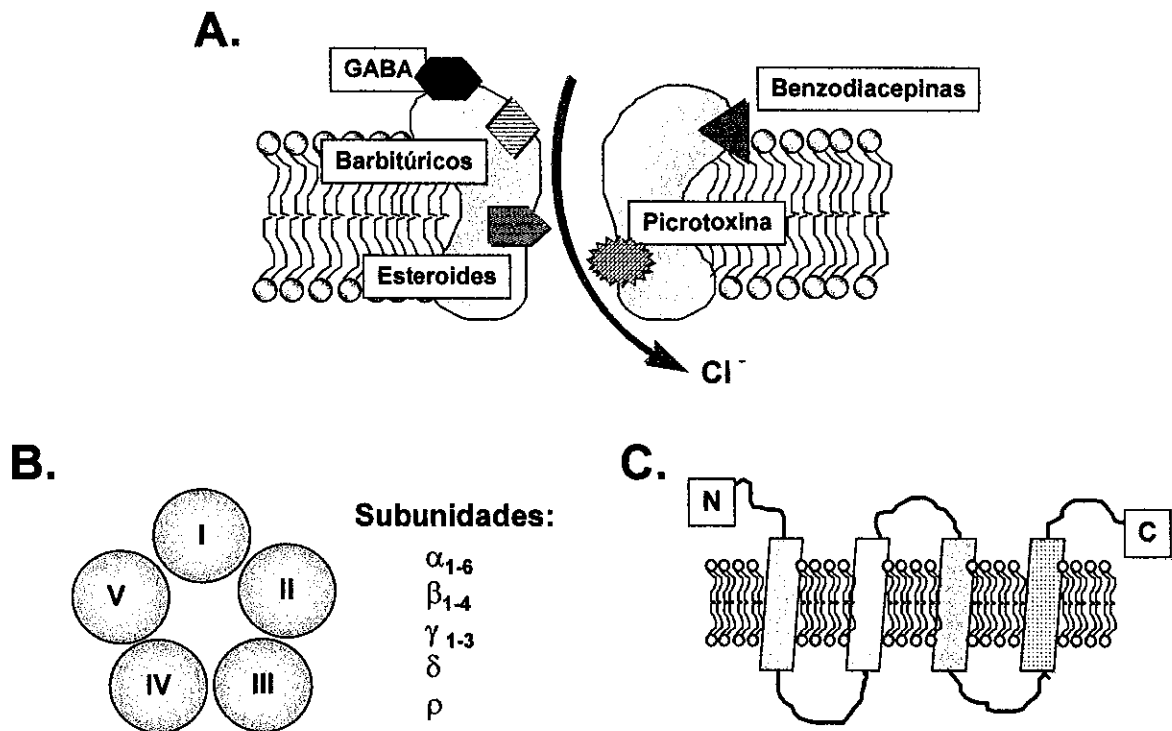
<b><i>GAD</i><sub>65</sub></b>	<b><i>GAD</i><sub>67</sub></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Peso molecular: 65.4 KD (585 aa)</li> <li>•Gen GAD2 (cromosoma 10 humano)</li> <li>•Transcrito: 5600 nucleótidos (región codificante: 1755 nucleótidos)</li> <li>•APOENZIMA</li> <li>•Actividad dependiente de PLP</li> <li>•Hidrofóbica (interacción con membranas)</li> <li>•Se localiza preferentemente en las prolongaciones neuronales</li> <li>•Función: inducible en respuesta a la actividad neuronal (actividad fásica)</li> <li>•Se activa durante la sinaptogénesis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Peso molecular: 66.6 KD (594-595 aa)</li> <li>•Gen GAD1 (cromosoma 2 humano)</li> <li>•Transcrito: 3700 nucleótidos (región codificante: 1782-1785 nucleótidos)</li> <li>•HOLOENZIMA</li> <li>•Actividad independiente de PLP</li> <li>•Hidrofílica</li> <li>•Se localiza preferentemente en el soma neuronal</li> <li>•Función: síntesis elevada (metabolismo) y continua de GABA (actividad tónica)</li> <li>•Se activa antes de la sinaptogénesis</li> </ul>

**FIGURA 1.** Síntesis de GABA a partir de Glu por activación de la GAD y Tabla Comparativa de las Características Generales de la *GAD*<sub>65</sub> y la *GAD*<sub>67</sub>.

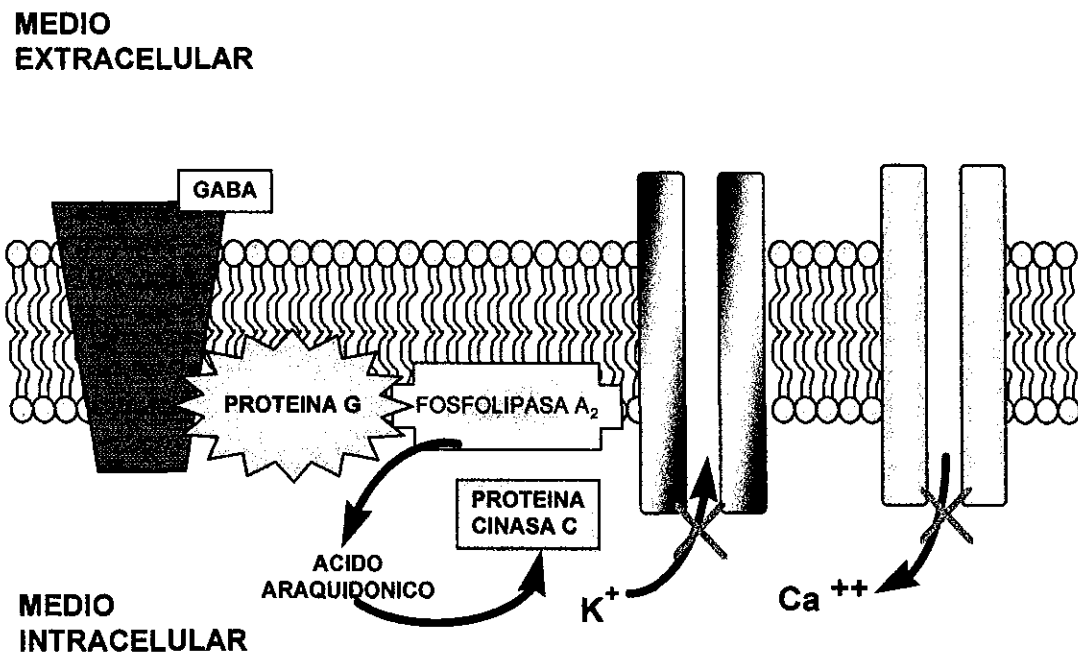


**FIGURA 2.** Sinapsis GABAérgica. 1) Síntesis del GABA; 2) Transporte del GABA hacia las vesículas sinápticas; 3) Liberación exocítica del GABA; 4) Interacción del GABA con el R-GABA<sub>A</sub>; 5) y 6) Interacción del GABA con el R-GABA<sub>B</sub> pre- y postsináptico, respectivamente; 7) Captura neuronal del GABA; 8) Captura astroglija del GABA; 9) Degradación metabólica del GABA dentro de la astroglija; y 10) Transporte de la Gln desde la astroglija hacia la neurona presináptica.





**FIGURA 3.** Receptor  $GABA_A$ . **A.** Configuración del canal permeable a  $Cl^-$  y de los múltiples sitios de modulación del receptor. **B.** Distribución de las subunidades para conformar el canal y listado de los tipos y subtipos de subunidades que pueden formar parte del receptor. **C.** Configuración transmembranal de cada una de las subunidades del receptor.



**FIGURA 4.** Receptor GABA<sub>B</sub>. El esquema muestra los mecanismos intracelulares activados por la interacción del GABA con este receptor, donde finalmente la Proteína Cinasa C modifica el estado de fosforilación de los canales iónicos para K<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> inactivándolos.

### **Captura plasmática del GABA**

El GABA extracelular puede activar tanto a sus receptores sinápticos como a los transportadores que se encargan de removerlo del espacio intersináptico. Estos transportadores se encuentran tanto en la membrana plasmática de neuronas GABAérgicas como en la de células gliales (Figura 2); y forman parte de una familia de intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  que acarrearán el neurotransmisor junto con el  $\text{Na}^+$  hacia el interior de las células (45). Actualmente, se acepta que existen por lo menos tres tipos de transportadores para GABA, conocidos como GAT1, GAT2 y GAT3, de los cuales GAT1 se expresa en la mayoría de las neuronas GABAérgicas, pero no de manera exclusiva, ya que se ha reportado su expresión en la glia de Bergmann y también, la existencia de células GABAérgicas que no expresan GAT1. Además, todos estos transportadores muestran afinidad alta por el GABA y poseen perfiles farmacológicos más o menos similares (46).

### **Degradación Bioquímica del GABA**

Dentro de las células nerviosas o gliales (principalmente astrocitos), la catálisis del GABA se lleva a cabo por acción de la transaminasa del GABA (GABA-T; EC 2.6.1.19) (Figura 2), enzima de la matriz interna mitocondrial que se encarga de transferir el grupo  $\alpha$ -amino del GABA al carbono  $\alpha$  del  $\alpha$ -cetoglutarato generándose semialdehído succínico y glutamato. Ambos productos de la GABA-T, pueden ingresar posteriormente al ciclo de los ácidos tricarbóxicos y relacionarse con el metabolismo celular (47). La GABA-T posee un peso molecular de 109,000 daltones y parece estar constituida por dos subunidades no idénticas de 53,000 y 58,000 daltones. Esta enzima, igual que todas las transaminasas, requiere de PLP como coenzima, sin embargo, su actividad no se modifica con cambios en la concentración de PLP libre, debido fundamentalmente a que el PLP se encuentra fuertemente unido a la apoenzima (8). Igual que la GAD, la GABA-T también se encuentra en otros, tales como hígado, riñón, páncreas, órganos reproductores y plaquetas (48).

### **ONTOGENIA DE LA NEUROTRANSMISION GABAérgica**

En la rata, durante la ontogénesis neuronal y hasta la cuarta semana de edad posnatal, suceden fenómenos de proliferación, migración, diferenciación, maduración y muerte celular programada, relacionados con el establecimiento de diferentes sistemas de neurotransmisión (49). En la corteza cerebral, aún antes de que se establezcan las sinapsis inhibitoras, existe una liberación tónica de GABA no sináptica que eleva la concentración extracelular del neurotransmisor (50). Además, la aparición de células GABAérgicas en la corteza cerebral, el hipocampo, el estriado y el cerebelo (49,51,52,53) parece estar asociada con el crecimiento de las prolongaciones neuronales, lo que sugiere que el GABA podría actuar como un factor neurotrófico durante la diferenciación temprana de los neuroblastos (49). En el hipocampo, por ejemplo, las interneuronas GABAérgicas aparecen en etapas tempranas del desarrollo embrionario y llegan a ser posmitóticas antes que las células granulares o piramidales (51). Así, aunque al nacimiento el sistema GABAérgico es funcional, durante las tres primeras semanas de vida, sufre modificaciones morfológicas y fisiológicas que le dan la apariencia del adulto (50).

Al parecer, la síntesis de GABA durante las primeras etapas del desarrollo ontogénico depende de la expresión de la GAD<sub>67</sub>, ya que la expresión de la GAD<sub>65</sub>, en cerebelo y estriado se hace evidente hasta la sinaptogénesis activa. Por lo que, la relación GAD<sub>65</sub>/GAD<sub>67</sub> comienza a incrementarse a finales de la primera y hasta la segunda semana de edad posnatal, dentro de las cuales la GAD<sub>67</sub> aparece en el soma de las células posnatales y la GAD<sub>65</sub> en las terminales nerviosas de sinapsis recién formadas. En general se considera que el pico más alto de la actividad total de la GAD (GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub>) se encuentra entre los 14 y 21 días de edad posnatal, tanto para la corteza cerebral, como para el hipocampo, el estriado y el cerebelo (40,51,52,53). De manera similar, la recaptura de GABA-Glicina a nivel vesicular, se incrementa significativamente durante la sinaptogénesis neuronal, lo que indica su importancia funcional en las terminales nerviosas recién formadas (52).

La maduración del sistema GABAérgico se acompaña también de la maduración de los receptores para GABA, los cuales sufren múltiples rearrreglos en

la expresión de ciertos tipos de subunidades durante el desarrollo posnatal de la rata (51). El R-GABA<sub>A</sub>, está presente desde el día posnatal 0, sin embargo, en esta etapa su activación produce despolarización y la generación de espigas. Al parecer, debido a la existencia de un gradiente de Cl<sup>-</sup> diferente y a la alta permeabilidad del canal para los iones bicarbonato, que conducen a la despolarización y a la activación de canales de Ca<sup>++</sup> sensibles a voltaje (51,54). El aumento en la concentración intracelular de Ca<sup>++</sup> debido a la activación del R-GABA<sub>A</sub>, modula la diferenciación neuronal, ya que antagonistas a este receptor reducen el número de neuritas primarias y sus puntos de ramificación, lo que provoca una disminución en la longitud neurítica (51).

Por otro lado, la activación de los R-GABA<sub>B</sub> presinápticos durante los primeros cinco días de edad posnatal, también genera una respuesta diferente, debido probablemente al desacoplamiento del receptor con las proteínas G. Sin embargo, el R-GABA<sub>B</sub> postsináptico conserva las características del adulto desde el primer día después del nacimiento (51).

Lo anterior, sugiere que la neurotransmisión GABAérgica es esencialmente excitadora durante las primeras etapas del desarrollo y que promueve la diferenciación neuronal de las células postsinápticas al elevar la concentración intracelular de Ca<sup>++</sup>. Por esta razón, pudiera sugerirse que durante el desarrollo posnatal temprano del SN, el GABA generaría la excitabilidad neuronal que posteriormente produce el glutamato y que se relaciona con los procesos de migración y diferenciación neuronal.

### ***FISIOLOGIA Y PATOFISIOLOGIA DEL SISTEMA GABAérgico***

En el adulto, el GABA controla la propagación de la actividad excitadora del cerebro, probablemente, al regular el grado de sincronía de las descargas neuronales (51). Lo anterior se confirmó mediante dos líneas de evidencias, una que demuestra que la reducción de la neurotransmisión GABAérgica conduce a la hiperexcitabilidad neuronal y a la generación de crisis convulsivas (55); y otra, que

comprueba los efectos anticonvulsivantes de diferentes drogas que elevan la neurotransmisión GABAérgica (56). Un ejemplo de la primera línea de evidencias, lo encontramos en los modelos de inducción de crisis epileptiformes por antagonistas del R-GABA<sub>A</sub>, tales como la bicuculina, la picrotoxina y la penicilina, entre otros (55). En la segunda línea, se observan los resultados obtenidos con el  $\gamma$ -vinil GABA o vigabatrina, compuesto que al inhibir la actividad de la GABA-T, eleva la concentración cerebral de GABA, previniendo la aparición de crisis convulsivas tanto a nivel experimental como a nivel clínico (56,57).

El sistema GABAérgico también está relacionado con los efectos sedativos de algunas drogas, tales como los barbituratos y las benzodiazepinas, las cuales se unen a sitios alostéricos del R-GABA<sub>A</sub>, modulando positivamente los efectos del GABA al incrementar la conductancia a Cl<sup>-</sup>. Así, algunos padecimientos psiquiátricos como la ansiedad, el estrés y la esquizofrenia, se relacionan con alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica (58).

Los cambios en la neurotransmisión GABAérgica se han asociados también con la memoria y la capacidad de aprendizaje, pues se ha observado que la administración de antagonistas al GABA, como la bicuculina y la picrotoxina, incrementan la retención en pruebas de evitación pasiva, evitación activa y de reconocimiento en laberintos. Además, tanto los agonistas GABA<sub>A</sub> (muscimol o etanol) como los GABA<sub>B</sub> (baclofen) reducen la retención en diferentes pruebas (59).

Por otro lado, las células GABAérgicas son altamente susceptibles a degenerar, en padecimientos neurodegenerativos (60), después de las crisis convulsivas (61), en modelos de hipoxia-isquemia (62) y en modelos de neurotoxicidad aguda o crónica (63). Procesos que de una u otra forma parecen estar asociados con los mecanismos neuroexcitotóxicos del glutamato y sus análogos (64).

## ANTECEDENTES

---

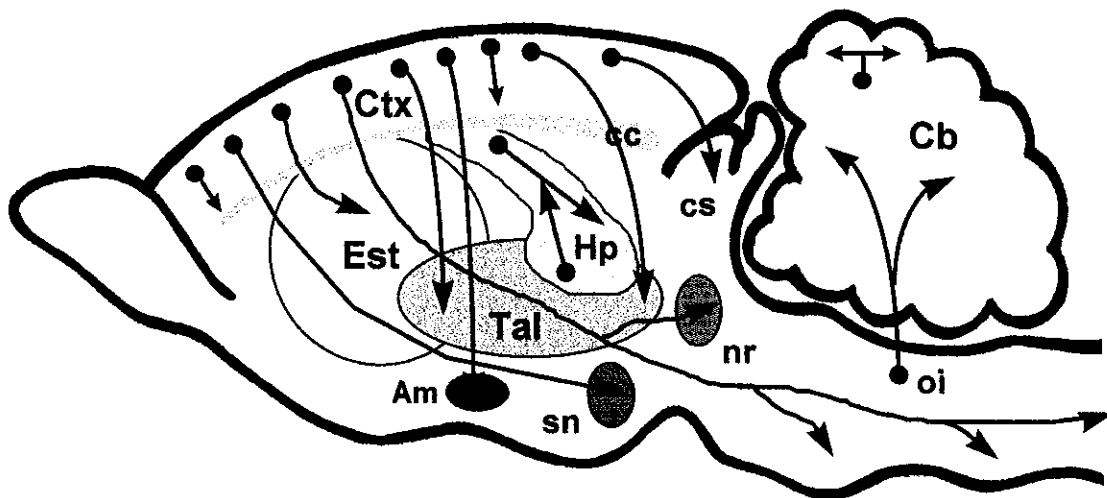
### **NEUROTRANSMISION GLUTAMATERGICA**

El conocimiento de que ciertos aminoácidos actúan como importantes mediadores de la transmisión nerviosa, proviene de evidencias experimentales que han demostrado la existencia de circuitos locales, receptores específicos, sistemas que eliminan el efecto sináptico, modificaciones durante el desarrollo e implicaciones en la función nerviosa, característicos para cada aminoácido neurotransmisor. Los aminoácidos acídicos, glutamato (Glu) y aspartato (Asp), ejercen un efecto excitador potente sobre las neuronas, en cambio sus respectivos productos de  $\alpha$ -descarboxilación, el GABA y la  $\beta$ -alanina, ejercen un gran efecto depresor (65).

Inicialmente, se conocía que la concentración del Glu dentro del cerebro excedía a la existente en los demás tejidos, por lo que se propuso que debía desempeñar una función importante como molécula clave en el metabolismo cerebral, o bien, como compensador de la deficiencia aniónica del cerebro (66), pero no como neurotransmisor. Entonces, se demostró que la aplicación exógena del Glu excitaba potentemente a las neuronas de la mayoría de las regiones cerebrales (65), concediéndosele por tanto una probable función neurotransmisora (67). Las evidencias experimentales recopiladas desde los años setentas, indican que el Glu es el principal neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos (68).

### **Vías de neurotransmisión glutamatérgica**

La mayoría de las vías glutamatérgicas son aferencias que se proyectan desde y hacia la corteza cerebral y el hipocampo. Estas vías incluyen la cortico-estriatal, la cortico-hipocampal, las cortico-corticales, la entorrinal-hipocampal; y las hipocampales y corticales que se dirigen hacia los núcleos hipotalámicos, talámicos y del tallo cerebral. Además, en el cerebelo existe una densidad alta de receptores glutamatérgicos y las células granulares de la corteza cerebelosa parecen ser esencialmente glutamatérgicas (69) (Figura 5).



**Am:** amígdala; **Cb:** cerebelo; **cc:** cuerpo calloso; **cs:** colículo superior;  
**Ctx:** corteza cerebral; **Est:** estriado; **Hp:** hipocampo; **nr:** núcleo rojo;  
**oi:** oliva inferior; **sn:** sustancia negra; y **Tal:** tálamo

**FIGURA 5.** Vías de neurotransmisión glutamatergica. El esquema muestra las inervaciones glutamatergicas de la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo, lo que sugiere que estas regiones pueden ser susceptibles a los efectos excitotóxicos del Glu.



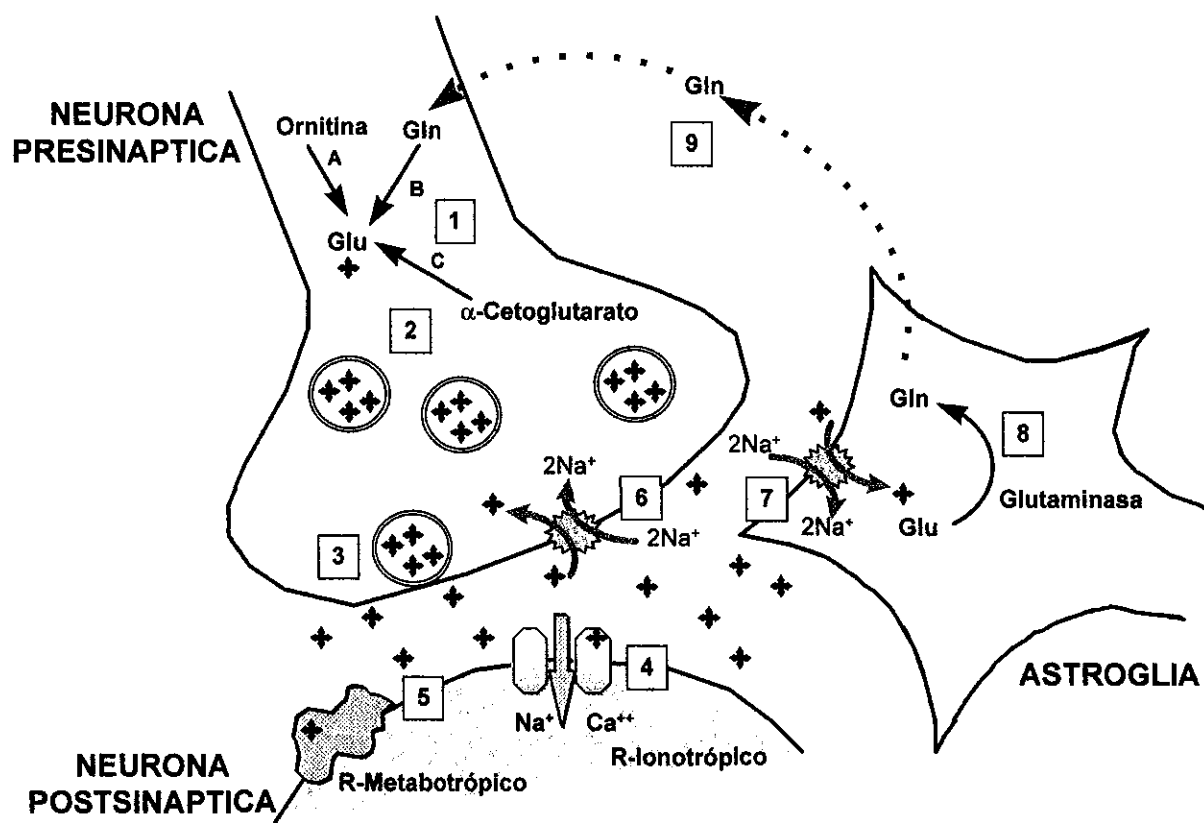
El Glu interactúa con otros sistemas de neurotransmisión, que convergen en los blancos de las aferencias glutamatérgicas. En el estriado, por ejemplo, se reciben múltiples inervaciones glutamatérgicas corticales, cuya actividad modula la liberación estriatal de dopamina, acetilcolina, GABA y serotonina (70).

### **Síntesis del Glutamato**

El Glu es un aminoácido no esencial, incapaz de penetrar al cerebro debido a la poca permeabilidad que tiene a través de la barrera hematoencefálica (69). Por esta razón, se sintetiza dentro del cerebro, a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato, la ornitina o la glutamina (Gln) (69). Los experimentos con precursores marcados demuestran que la mayor parte del Glu que actúa como neurotransmisor se sintetiza a partir de la Gln (67). Las células gliales desempeñan una función importante en la interconversión del Glu a Gln, ya que recapturan el Glu del espacio intersticial y lo convierten en Gln por acción de la glutaminasa, entonces la Gln glial se secreta y las neuronas glutamatérgicas la recapturan para que la sintasa de glutamina, la convierta en Glu (71). Dentro de las terminales nerviosas glutamatérgicas el Glu se transporta al interior de vesículas por un proceso dependiente de ATP similar al del GABA (67) (Figura 6).

### **Liberación del Glutamato**

El Glu puede liberarse de la terminal presináptica a través de dos mecanismos diferentes: uno, independiente de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{++}$ , a través de la inversión de la recaptura del neurotransmisor; y otro, dependiente del aumento en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{++}$ , a través de la exocitosis de las vesículas sinápticas (72) (Figura 6). Estos dos mecanismos pueden distinguirse claramente mediante el empleo de fluorometría continua, la cual permite monitorear la liberación del aminoácido y la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  a la terminal nerviosa de manera simultánea (73).



**FIGURA 6.** Sinapsis Glutamatergica. 1) Síntesis del Glu (A. Ornitina aminotransferasa; B. Sintasa de Gln; y C. Deshidrogenasa del Glu); 2) Transporte del Glu hacia las vesículas sinápticas; 3) Liberación exocítica del Glu; 4) Interacción del Glu con receptores ionotrópicos; 5) Interacción del Glu con receptores metabotrópicos; 6) Captura neuronal del Glu; 7) Captura astrogliyal del Glu; 8) Degradación metabólica del Glu dentro de la astrogliya; y 9) Transporte de la Gln desde la astrogliya hacia la terminal glutamatergica. En el esquema se muestran receptores glutamatergicos postsinápticos, sin embargo, también se ha descrito su existencia a nivel presináptico.

Una disminución en la proporción citosólica de ATP/ADP puede acelerar la liberación de Glu por cualquiera de los dos mecanismos. La liberación de Glu independiente de  $\text{Ca}^{++}$  se eleva cuando existe alguna alteración en la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , condición que disminuye el gradiente transmembranal de  $\text{Na}^+$  y favorece el cotransporte reverso  $\text{Na}^+/\text{Glu}$  (74). Además, una alteración en la ATPasa- $\text{Ca}^{++}$  aumenta la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{++}$ , lo que favorece la liberación de Glu dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  (72).

### **Captura plasmática del Glutamato**

El Glu que se libera hacia el espacio intersináptico, se remueve a través de un mecanismo de recaptura de alta afinidad dependiente de  $\text{Na}^+$  (cotransporte  $\text{Na}^+/\text{Glu}$ ) (75). La dependencia de  $\text{Na}^+$  es absoluta y se requieren dos iones  $\text{Na}^+$  para transportar una molécula de Glu (76). La recaptura del Glu que realizan las células gliales es probablemente el mecanismo más importante para la inactivación del neurotransmisor. Dentro de los astrocitos el Glu se transforma en Gln (77) (Figura 6).

Recientemente, se describieron cinco isoformas diferentes de transportadores plasmáticos para el Glu, conocidas como EAAT1-5. Estos transportadores tienen patrones de hidrofobicidad muy semejantes y sus secuencias de aminoácidos son de 30 a 50% idénticas (78). En todos los casos la recaptura del Glu se acopla a un cotransporte con  $\text{Na}^+$ , sin embargo, puede asociarse también con el transporte de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  ( $\text{OH}^-$  o  $\text{HCO}_3^-$ ), iones que se desplazan siguiendo su gradiente de concentración a través de la misma estructura proteica (78). De esta forma, la recaptura del Glu se relaciona con cambios en el potencial de membrana y en el pH. Además, la recaptura del Glu permite el flujo de  $\text{Cl}^-$ , sin embargo, el movimiento de este ión no está termodinámicamente acoplado con el transporte (78). EAAT2 es el transportador para el Glu más abundante, representa cerca del 1% del total de las proteínas cerebrales y se encuentra principalmente en astrocitos, igual que EAAT1. En cambio, EAAT4-5 se encuentran fundamentalmente en neuronas; y EAAT3 en neuronas y astrocitos (78).

## Receptores glutamatérgicos

El Glu ejerce su efecto excitador a través de la activación de dos tipos de receptores, comúnmente clasificados como ionotrópicos (79) y metabotrópicos (80) (Figura 7).

Los **receptores ionotrópicos glutamatérgicos** actúan como canales iónicos activados por ligando; permiten la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$ ; despolarizan rápidamente la neurona; y se clasifican en receptores para el N-Metil-D-Aspartato (R-NMDA), para el ácido propiónico 3-amino-4-hidroxi-5-metil isoxasol (R-AMPA) y para el ácido kaínico (R-KA), de acuerdo con su afinidad por agonistas específicos (81,82,83) (Figura 7). Estructuralmente, estos receptores actúan como complejos macromoleculares oligoméricos formados por 5 subunidades polipeptídicas. Cada subunidad posee cuatro dominios hidrofóbicos (M1-4), de los cuales M1, M3 y M4 atraviesan completamente la membrana, en tanto que M2 entra a la membrana y regresa al citoplasma sin tocar la cara extracelular. De esta forma, las subunidades tienen el grupo amino terminal en la cara extracelular y el carboxilo terminal en la cara intracelular de la membrana plasmática (84,85) (Figura 8). De cada una de las subunidades que integran los receptores ionotrópicos glutamatérgicos existen múltiples variantes de expresión y empalme, las cuales al combinarse alternativamente, permiten la estructuración de receptores funcionalmente diferentes con afinidad por el mismo agonista selectivo (84).

El **R-NMDA** se caracteriza por ser dependiente de voltaje, es altamente permeable a  $\text{Ca}^{++}$  y cuenta con múltiples sitios de regulación farmacológica, entre los que se incluyen sitios de unión para: 1)el transmisor, sus agonistas y antagonistas competitivos; 2)glicina (coagonista); 3)fenciclidina y MK801 (bloqueadores del canal iónico); 4) $\text{Mg}^{++}$  (bloqueador del canal iónico sensible a la despolarización); 5) $\text{Zn}^{++}$  (modulación positiva del canal); y 6)poliaminas (modulación positiva o negativa, dependiendo del compuesto y de la concentración del mismo), además de un sitio sensible a cambios de óxido-reducción (85,86,87). Este receptor puede estar formado por la combinación de las subunidades NR1 y NR2A-D, de las cuales NR1 determina la existencia de un canal funcional y NR2A-D las propiedades

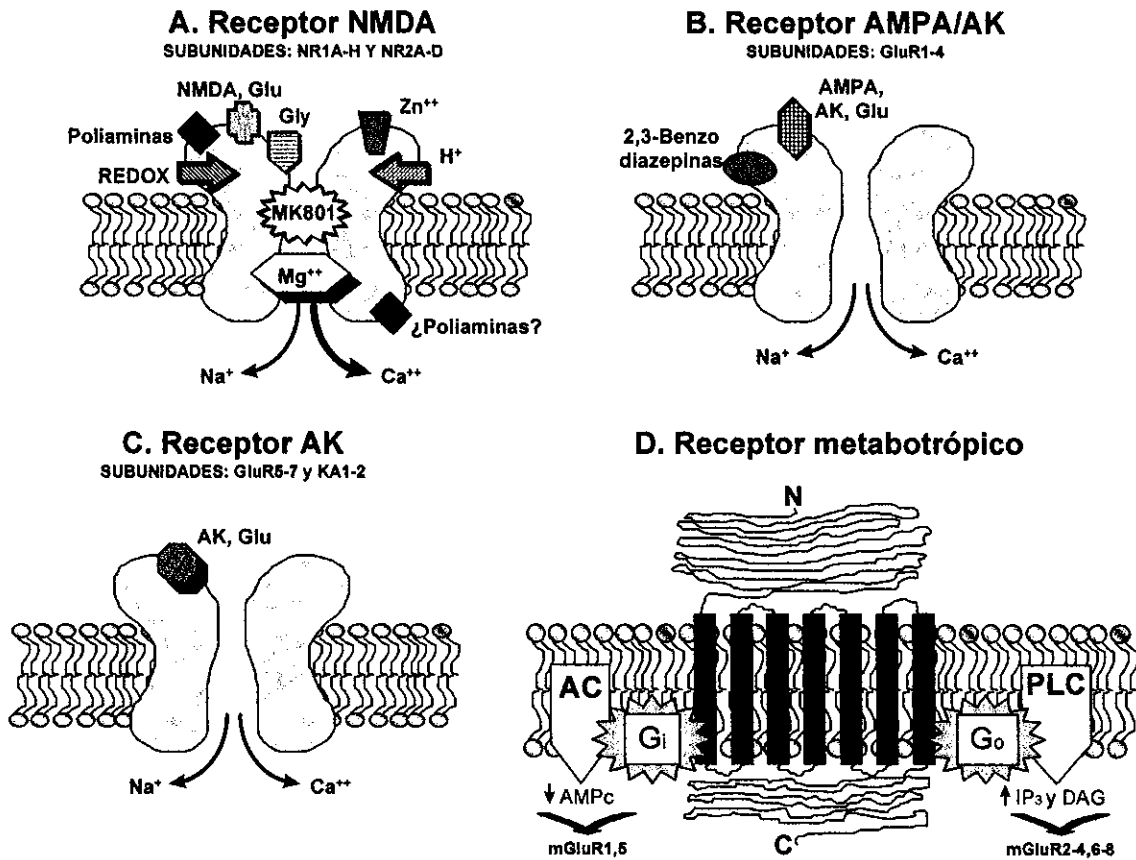
electrofisiológicas del canal (88,89) (Figura 7).

Los **receptores no-NMDA** (AMPA y KA) son independientes de voltaje, exhiben mayor permeabilidad para el  $\text{Na}^+$ , son los responsables de la transmisión sináptica excitadora rápida y se distribuyen ampliamente dentro del SN (90). En el caso de los **R-AMPA**, que también unen ácido kaínico pero con baja afinidad, pueden estar formados por las subunidades GluR1-4, las cuales durante la maduración del ARNm, dan lugar a variantes de empalme que originan receptores con diferente permeabilidad iónica (89,90,91). Los **R-KA** pueden estar formados por las subunidades GluR5-7 en combinación con KA1-2, proteínas que tienen una mayor afinidad de unión para el KA (90,92) (Figura 7).

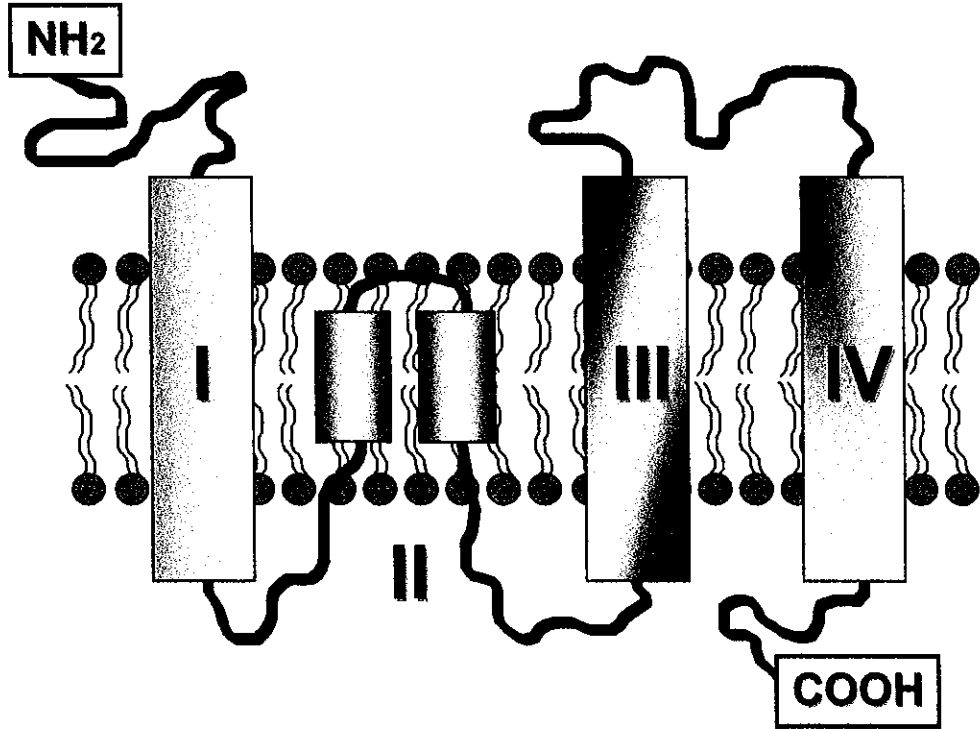
Por otro lado, los **receptores metabotrópicos glutamatérgicos** interactúan con proteínas-G y promueven la activación de cascadas de segundos mensajeros. Se componen de una sola cadena polipeptídica, la cual cuenta con siete dominios transmembranales y dos hidrofílicos, uno en la cara extracelular con el extremo amino y otro en la cara intracelular con el extremo carboxilo (93). Dentro del SN, existen por lo menos, 8 subtipos de receptores metabotrópicos glutamatérgicos, conocidos como mGluR1-8. En el caso de mGluR1 y mGluR5 su activación se relaciona con la estimulación de la fosfolipasa C y la producción de  $\text{IP}_3$  y DAG, en tanto que la activación de mGluR2-4 y mGluR6-8 inhibe a la adenilato ciclasa y reduce los niveles de AMPc (93,94) (Figura 7).

### **IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LA NEUROTRANSMISION GLUTAMATERGICA**

El Glu, a través de la activación de sus diferentes tipos de receptores, parece estar asociado con muchas de las funciones del SN. La activación del R-NMDA favorece la plasticidad neuronal, en procesos tales como el aprendizaje, la memoria, la dominancia ocular, la especificidad sináptica y el crecimiento neuronal; y controla la transmisión sensorial visual, la respiración y la presión sanguínea (87,90).



**FIGURA 7.** Receptores Glutamatérgicos. Los esquemas muestran los mecanismos activados por la interacción del Glu con los receptores ionotrópicos (A, B, y C) y metabotrópicos (D), así como los tipos y subtipos de subunidades que pueden conformar a dichos receptores. En el caso del R-NMDA, se muestran los múltiples sitios de modulación y del bloqueo de la corriente iónica activada por este receptor.



**FIGURA 8.** Configuración transmembranal de las subunidades proteicas que componen a los receptores ionotrópicos glutamatérgicos.

Además, el R-NMDA también participa en el establecimiento de algunas alteraciones neurológicas, tales como el daño cerebral isquémico, el daño neuronal hipoglucémico, la epilepsia, la esclerosis lateral múltiple y la atrofia olivopontocerebelar (87) (Figura 9). Condiciones que han impulsado al desarrollo de antagonistas cada vez más potentes y selectivos, como posibles medidas terapéuticas.

Comúnmente, una célula neuronal que expresa R-NMDA, también cuenta con receptores no-NMDA, los cuales parecen ser importantes para generar una despolarización rápida y eliminar el bloqueo dependiente de voltaje que ejerce el  $Mg^{++}$  sobre el canal del R-NMDA (95,96). Además, se ha demostrado la presencia de receptores no-NMDA sobre terminales glutamatérgicas, los cuales al activarse promueven la liberación del Glu (95). Por otro lado, tanto los antagonistas NMDA como los no-NMDA protegen efectivamente contra las crisis convulsivas (97,98,99) o el daño neuronal (100,101) producidos por el Glu y también pueden evitar los fenómenos de potenciación de largo término (LTP) (102) o depresión de largo término asociados con la plasticidad neuronal (LTD) (87).

### **NEURODEGENERACION EXCITOTOXICA**

Hace aproximadamente 40 años, Lucas y Newhouse, tratando de encontrar algún compuesto que pudiera disminuir la distrofia retiniana, descubrieron que la inyección sistémica del Glu destruía la capa neuronal interna de la retina inmadura del ratón (103). Doce años después, junto con la propuesta de que el Glu podía actuar como neurotransmisor dentro del SNC, se demostraron sus efectos tóxicos no sólo en las células de la retina, sino también en neuronas de ratones (104), ratas (105) y monos (106) recién nacidos. En 1971, Olney acuñó el término de **excitotoxicidad** para referirse a la muerte neuronal producida por sobreactivación de los receptores glutamatérgicos (107). La gran cantidad de estudios realizados en diferentes sistemas neuronales, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre el proceso



neurodegenerativo inducido por el Glu, ha permitido proponer que los mecanismos excitotóxicos pueden estar implicados en la muerte neuronal (Figura 9) producida por el trauma cerebral (108), la epilepsia (109) y el envenenamiento con domoato (110). Además, se cree que también pueden estar relacionados con algunos padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Huntington, Alzheimer o Parkinson (83,100). Respecto a esto, se ha observado que las lesiones producidas por análogos del Glu en las células estriatales se asemejan a las encontradas en la corea de Huntington (111).

Estudios *in vitro* han demostrado que dependiendo del esquema de aplicación, el Glu puede generar diferentes procesos neurodegenerativos. Así, exposiciones breves al Glu producen **muerte neuronal aguda**, caracterizada por cambios neurodegenerativos inmediatos, tales como la picnosis nuclear y la inflamación edematosa del soma neuronal y las dendritas, procesos iniciados por trastornos en el flujo transmembranal de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Por otro lado, la exposición prolongada al Glu produce **muerte neuronal retardada**, la cual depende de una entrada masiva de  $\text{Ca}^{++}$  y requiere de varias horas para presentarse (112).

La sobreactivación de los receptores glutamatérgicos, eleva excesivamente la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{++}$ , lo que promueve la activación de diferentes procesos implicados en la muerte neuronal, entre ellos: 1) la generación de radicales libres que inducen la lipoperoxidación de los lípidos membranales (113) (Figura 10); 2) la síntesis de óxido nítrico, molécula que puede actuar como retromensajero y potenciar la liberación del Glu incrementando su efecto excitotóxico (114) (Figura 10); 3) la activación inespecífica de múltiples cadenas enzimáticas, condición que alteraría las vías de señalización intracelular y favorecería la proteólisis del contenido citoplasmático (113) (Figura 10); y 4) alteraciones mitocondriales relacionadas con disminuciones en el metabolismo energético, lo que promovería la generación de radicales libres (115) (Tabla 1).

Recientemente, se ha sugerido que la neurodegeneración iniciada por el Glu depende en gran medida del estado funcional de la mitocondria, debido a que

disminuciones en la tasa metabólica celular alteran la homeostasia del  $\text{Ca}^{++}$ , condición inductora de la muerte neuronal (114,115,116) (Tabla 1). Además, se conoce que dependiendo del estado mitocondrial o de la intensidad del daño, el Glu puede desencadenar muerte celular por apoptosis o necrosis (114,117,118), de manera semejante a la muerte celular retardada o aguda, respectivamente (112,119).

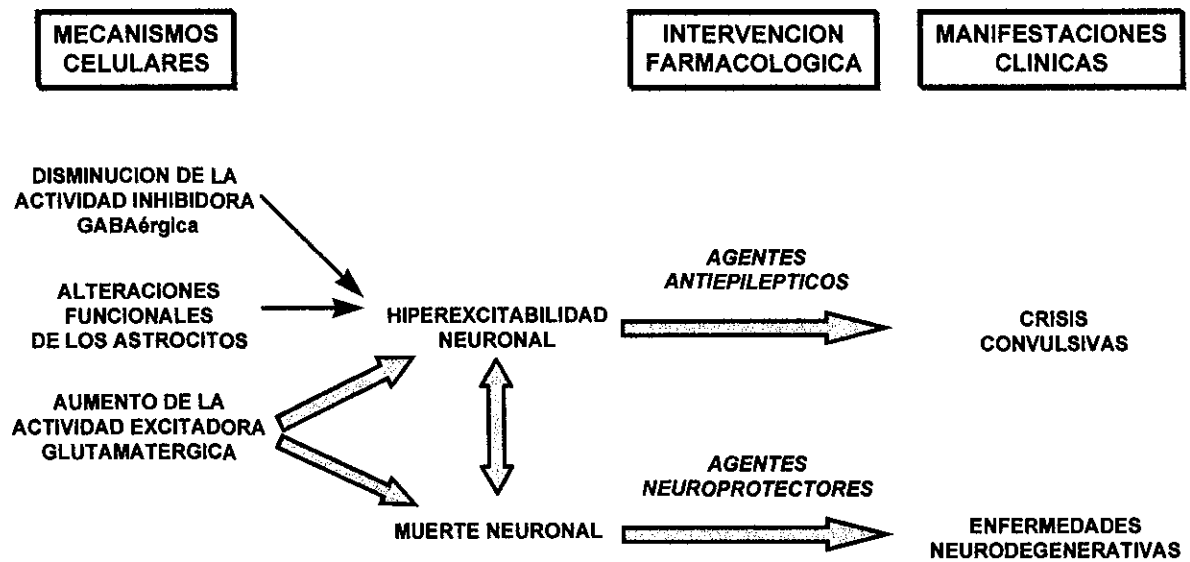
De esta forma, se ha propuesto que la excitotoxicidad puede estar implicada en algunos padecimientos neurodegenerativos, relacionados con alteraciones en la función mitocondrial, tales como la enfermedad de Huntington y el Parkinson (120,121). Así, algunos antagonistas glutamatérgicos poseen efectos protectores contra las lesiones neurotóxicas inducidas por los inhibidores de la función mitocondrial: malonato (120) y ácido 3-nitropropiónico (121), lesiones que tienen semejanza con las observadas en dichos padecimientos.

#### **ADMINISTRACION NEONATAL DE GLUTAMATO MONOSODICO**

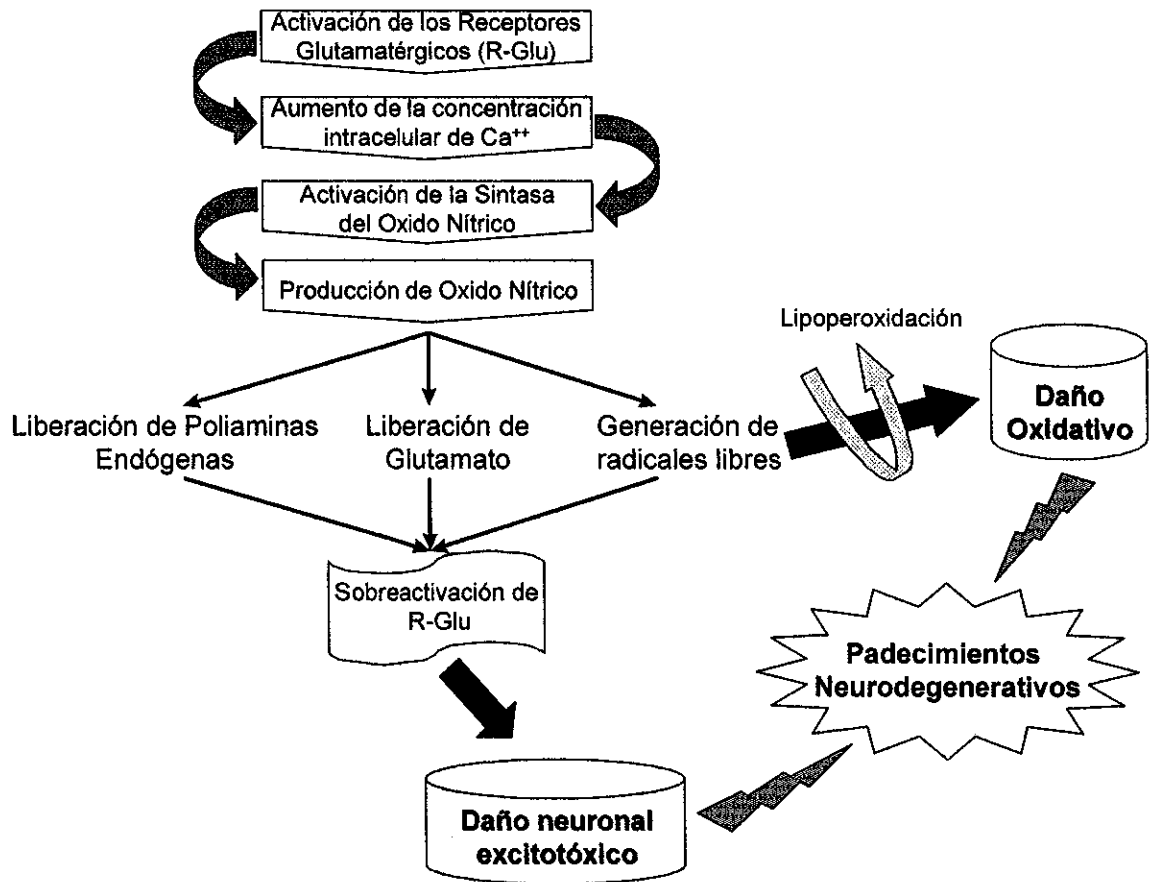
La administración sistémica del glutamato monosódico (GMS) se ha utilizado ampliamente para caracterizar la susceptibilidad neuronal a los efectos excitotóxicos del Glu *in vivo*. Así, se ha demostrado que prácticamente todas las especies de mamíferos son susceptibles a la excitotoxicidad inducida por el Glu. Sin embargo, la severidad de la lesión depende de la especie, la edad y el sexo, así como de la vía de administración del GMS (122). Particularmente, los animales recién nacidos son más susceptibles al GMS, lo cual puede deberse a una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica para el Glu (70), a que los sistemas de recaptura para Glu no están bien establecidos todavía (123) y a la presencia de receptores ionotrópicos glutamatérgicos que generan una corriente de  $\text{Ca}^{++}$  de mayor intensidad y duración que la observada en los adultos (89,91), dichas condiciones podrían potenciar los efectos tóxicos del Glu.

La caracterización de la susceptibilidad de los diferentes sistemas de neurotransmisión a los efectos neurotóxicos del Glu en animales recién nacidos, es

importante, pues podría brindar luz sobre algunos padecimientos neuronales que se presentan después de la hipoxia-isquemia neonatal, tales como las crisis convulsivas la degeneración de áreas circunventriculares, ya que tanto en la hipoxia como en la isquemia cerebral existe un aumento excesivo de la concentración intracerebral del Glu (87). De este modo, en nuestro laboratorio se ha utilizado el modelo de la administración neonatal de GMS, para tratar de establecer la susceptibilidad que tienen los sistemas de neurotransmisión colinérgica y GABAérgica al efecto excitotóxico del Glu, ya que estos sistemas se ven particularmente afectados en diversos padecimientos neurodegenerativos. Así, recientemente se ha demostrado que el tratamiento neonatal con GMS produce alteraciones ultraestructurales en la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo de la rata (123); asociadas con cambios en la actividad de la colina-acetil-transferasa, en la densidad y afinidad de receptores muscarínicos (124). Además, también se han reportado alteraciones en los patrones de unión de [<sup>3</sup>H]-Glu (125) y [<sup>3</sup>H]-KA (126); así como en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA estimulada por <sup>+</sup>K en las mismas regiones cerebrales (123). Por lo que, en el presente trabajo, se determinó la densidad de células GABAérgicas, la actividad enzimática total y las propiedades cinéticas de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC 4.1.1.15) en diferentes regiones cerebrales con inervación glutamatérgica y sensibles a degenerar, después del tratamiento neonatal con GMS.



**FIGURA 9.** Mecanismos celulares implicados en el establecimiento de las crisis convulsivas y las enfermedades neurodegenerativas. Nótese que el aumento en la neurotransmisión glutamatérgica se asocia con ambos padecimientos.



**FIGURA 10.** Mecanismos celulares implicados en la excitotoxicidad generada por la sobreactivación de los receptores glutamatergicos.

**TABLA 1. INTERACCIONES ENTRE LOS MECANISMOS BIONERGETICOS Y EXCITOTOXICOS**

Evento	Alteración inicial	Alteración secundaria
↓ [ATP] celular	Despolarización celular debido a una disminución en la actividad de la ATPasa-Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	Eliminación del bloqueo dependiente de voltaje ejercido por el Mg <sup>++</sup> sobre el R-NMDA
Activación del R-NMDA	Aumento de las concentraciones citosólicas de Na <sup>+</sup> y Ca <sup>++</sup>	Elevación de la recaptura mitocondrial de Ca <sup>++</sup> . Activación de lipasas, proteasas y de la sintasa del óxido nítrico
Disminución de la salida de Na <sup>+</sup> debido a una reducción en la actividad de la ATPasa-Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	Disminución del intercambio de Na <sup>+</sup> /Ca <sup>++</sup> y de la recaptura de glutamato dependiente de Na <sup>+</sup>	Aumento en la concentración citosólica de Ca <sup>++</sup> y en la concentración extracelular de glutamato
Alteración metabólica-mitocondrial	Despolarización mitocondrial debido a una disminución en el flujo de protones durante la cadena respiratoria	Disminución de la recaptura mitocondrial de Ca <sup>++</sup> , lo que promueve la elevación de la de Ca <sup>++</sup>
Alteración metabólica-mitocondrial	Mayor producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno, es decir, de radicales libres	Aumento en la permeabilidad mitocondrial y daño metabólico

Tomada de Greene y Greenamyre, 1996.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Evidencias recientes proponen la asociación entre el establecimiento de padecimientos neurodegenerativos y el daño neuronal excitotóxico producido por la activación excesiva de los receptores glutamatérgicos (R-Glu). Por otro lado, se ha observado que diferentes neurotoxinas inducen muerte neuronal en regiones cerebrales donde existen densidades altas de R-Glu. Además, se ha demostrado que las células GABAérgicas son altamente susceptibles a degenerar, tanto en padecimientos neuronales como en los modelos de neurotoxicidad. Uno de los modelos utilizados, para la caracterización de la muerte neuronal excitotóxica, consiste en la administración de glutamato monosódico (GMS) por vía sistémica a animales recién nacidos. Dicho tratamiento modifica la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA estimulada por <sup>+</sup>K en rebanadas de diferentes regiones cerebrales, sin embargo, se desconoce si estas modificaciones se deben a la degeneración de las neuronas GABAérgicas. Comúnmente, las alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica se relacionan con cambios en la densidad de células GABAérgicas, así como en la actividad de la enzima sintetizadora del GABA, la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC 4.1.1.15). Por lo que, en este trabajo se evaluó el efecto del tratamiento neonatal con GMS sobre la densidad de células positivas a la inmunocitoquímica para GABA y sobre la actividad y propiedades cinéticas de la GAD en la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo de la rata, regiones con inervación glutamatérgica y susceptibles a degenerar en diferentes padecimientos neuronales.

## HIPOTESIS

---

Si el sistema GABAérgico es sensible al efecto excitotóxico del glutamato, la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC 4.1.1.15) y la densidad de células GABAérgicas se reducirán en diferentes regiones cerebrales con inervación glutamatérgica, después del tratamiento neonatal con GMS.



## OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la densidad de células GABAérgicas, la actividad total y las propiedades cinéticas de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC 4.1.1.15) en diferentes regiones del cerebro de la rata después del tratamiento neonatal con glutamato monosódico (GMS).

### OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el efecto de la administración neonatal del GMS sobre la actividad enzimática total de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; EC 4.1.1.15) en la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo de la rata a los 14, 21, 30 y 60 días de edad posnatal.
2. Analizar las propiedades cinéticas de la GAD ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) en la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo de la rata a los 14, 21, 30 y 60 días de edad posnatal después del tratamiento neonatal con GMS.
3. Determinar el efecto de la administración neonatal de GMS sobre la densidad de células GABAérgicas en la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo de la rata a los 60 días de edad posnatal.

## MATERIALES Y METODOS

---

### Material Biológico

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas macho, recién nacidas de la cepa Wistar, las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio (ciclos luz-oscuridad 12X12h, temperatura ambiental 25°C y humedad relativa 40%) con libre acceso al agua y al alimento hasta la edad de sacrificio.

### Diseño y Tratamiento de Grupos

Los animales utilizados se dividieron en tres grupos de trabajo:

**Grupo I:** Animales intactos que no recibieron ningún tratamiento (*Grupo Intacto*).

**Grupo II:** Animales a los que se les administró NaCl equimolar a la concentración de sodio contenida en el glutamato monosódico, correspondiente a una dosis de 1.38 mg/g de peso corporal por vía subcutánea los días 1, 3, 5 y 7 de edad posnatal (*Grupo Testigo*).

**Grupo III:** Animales que fueron tratados con glutamato monosódico (GMS) a la dosis de 4 mg/g de peso corporal por vía subcutánea los días 1, 3, 5 y 7 de edad posnatal (*Grupo Experimental*).

Los grupos de trabajo se manejaron en camadas de 8 animales, cada una formada por 4 animales experimentales y 4 animales control (intactos o testigos), de manera que estuvieran sometidos a las mismas condiciones.

El sacrificio de los animales se realizó por decapitación a los 14, 21, 30 y 60 días de edad posnatal, entre las 8:00 y las 9:00 horas del día.

### Actividad de la Descarboxilasa del Acido Glutámico (GAD)

Para determinar la actividad de la GAD, los animales se sacrificaron por decapitación, se extrajo el cerebro inmediatamente y se mantuvo a 4°C en un baño frío de sacarosa 0.32 M para disecar las regiones de interés: corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo. Los tejidos se mantuvieron en frío y se homogeneizaron en

sacarosa 0.32 M (1000  $\mu\text{g}$  de prot/100  $\mu\text{l}$ ). Los homogeneizados de tejido cerebral se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el día siguiente.

La actividad de la GAD, se determinó al cuantificar la cantidad de  $[^{14}\text{C}]\text{O}_2$  liberado a partir de la transformación de 1- $[^{14}\text{C}]\text{-L-Glutamato}$  ( $[^{14}\text{C}]\text{-Glu}$ ) en GABA (Figura 1).

El ensayo enzimático se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Tapia y Salazar (1991) (127) para determinar la actividad total de la GAD (GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub>) y consistió brevemente en lo siguiente. En tubos de vidrio de 1 ml se colocaron 90  $\mu\text{l}$  de tejido (800-900  $\mu\text{g}$  de proteína), se agregaron 20  $\mu\text{l}$  del cofactor fosfato de piridoxal (PLP; 0.2 mM), 20  $\mu\text{l}$  de glutamato frío y 20  $\mu\text{l}$  de 1- $[^{14}\text{C}]\text{-Glu}$  (Actividad específica 0.05  $\mu\text{Ci}/1.5 \mu\text{mol}$ , equivalente a 10 mM de Glu). Enseguida, cada tubo con la mezcla de reacción se conectó con otro tubo que contenía 200  $\mu\text{l}$  de hidróxido de benzetonio (Hyamina; capturador de  $\text{CO}_2$ ), ya conectados ambos tubos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en un baño María con agitación por 30 min, después de los cuales se detuvo la reacción agregando a la mezcla 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  6 N, ambos tubos permanecieron en el baño María con agitación durante una hora más, para permitir la fijación del  $\text{CO}_2$  capturado. Transcurrido ese tiempo, cada pareja de tubos se desconectó y el tubo con Hyamina se colocó en un vial, al cual se le agregaron 10 ml de líquido de centelleo. La cuantificación de la radiactividad se llevó a cabo, al día siguiente, en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6000. La actividad enzimática de cada muestra se determinó por triplicado. En cada ensayo se incluyeron además de las muestras, un blanco de reactivos que en vez de tejido tenía 90  $\mu\text{l}$  de sacarosa 0.32 M y un blanco de tejido con proteína desnaturizada por calentamiento excesivo, los cuales se utilizaron para estimar la radiactividad inespecífica. La concentración de proteínas de cada una de las muestras se determinó por el método de Lowry (128).

Los resultados se expresan como  $\text{CO}_2$  liberado en nmol/mg de proteína/30 min y representan la media  $\pm$  la desviación estándar de la media de 8-12 experimentos por triplicado.

### **Cinética de la GAD**

Para determinar las propiedades cinéticas de la GAD se evaluó su actividad utilizando las siguientes concentraciones de Glu 0.75, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 y 20 mM, bajo el procedimiento descrito con anterioridad.

La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) se determinaron mediante la transformación de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk. Los valores de  $K_m$  se expresan en concentración mM y la  $V_{max}$  en nmol/mg de proteína/30 min.

Los resultados muestran la media  $\pm$  la desviación estándar de la media de 3 experimentos con determinaciones por triplicado para cada punto de la curva.

### **Inmunocitoquímica de las células GABAérgicas**

Los animales utilizados para la inmunocitoquímica de las células GABAérgicas, se perfundieron por vía intracardiaca con solución lavadora (amortiguador de fosfatos de sodio (PB) 0.1 M, pH 7.4) hasta la decoloración de los pulmones y el hígado; posteriormente, se perfundieron con solución fijadora (paraformaldehído 4% y glutaraldehído 0.5% en PB 0.1 M, pH 7.4) hasta la rigidez total de la cola (129,130).

Inmediatamente después de la perfusión, se extrajo el cerebro y se mantuvo en solución fijadora durante una semana (131). Transcurrido este tiempo, se separaron el cerebro, el cerebelo y el tallo cerebral. Del cerebro se obtuvieron cortes corónales seriados de 40  $\mu$ m de grosor, donde se realizaron las observaciones de la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo. Los cortes se realizaron en un microtomo de vibración (Leica VT-10000M) y fueron colectados en amortiguador salino de fosfatos de sodio (PBS) 0.1 M, pH 7.4.

La inmunocitoquímica del GABA se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Orozco-Suárez, S. (1997) (131). Los cortes se transfirieron a cajas de cultivo de 24 pozos y se incubaron durante una hora en Tritón X-100 0.5% en PBS 0.1 M (pH 7.4) durante 1 h. Posteriormente, con el objeto de restablecer la antigenicidad del tejido, las rebanadas se sometieron a un calentamiento máximo

con microondas en amortiguador de citratos de sodio (CB) 0.01 M (pH 6) por 25 s. Inmediatamente después, se les agregó CB 0.01 M (pH 6) fresco y se incubaron por 20 min. Enseguida se lavaron con PBS 0.1 M (pH 7.4), en dos ocasiones, cada una por 5 min. Después de los lavados, las rebanadas se incubaron con suero normal de cabra 1:200 en PBS 0.1 M (pH 7.4) adicionado con albúmina de suero bovino (BSA) 0.1% durante 30 min. Posteriormente, se agregó el anticuerpo anti-GABA 1:1000 (policlonal de conejo, SIGMA, A-2052) en PBS 0.1 M (pH 7.4) con BSA 0.1% por 48 h en temperatura ambiente con agitación constante. Enseguida, se eliminó el anticuerpo primario mediante dos lavados con Tritón X-100 0.1% en PBS 0.1 M (pH 7.4) cada uno de 5 min. Posteriormente, las rebanadas se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de conejo 1:200 (Vectastain Elite ABC Kit, rabbit IgG, Vector Laboratories) en PBS 0.1 M (pH 7.4) con BSA 0.1% por 2 h. El anticuerpo secundario se eliminó, nuevamente a través de dos lavados con Tritón X-100 0.1% en PBS 0.1 M (pH 7.4) cada uno de 5 min. Entonces, se les agregó el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC Kit, rabbit IgG, Vector Laboratories), donde se incubaron durante 1 h. Después, de dos lavados con Tritón X-100 0.1% en PBS 0.1 M (pH 7.4) cada uno de 5 min, se reveló la tinción inmunocitoquímica con diaminobenzidina (DAB) 0.05% y peróxido de hidrógeno 0.03% en PBS 0.1 M (pH 7.4) por 15-30 s. Finalmente, las rebanadas se sometieron a dos lavados con Tritón X-100 0.1% en PBS 0.1 M (pH 7.4) cada uno de 5 min, después de los cuales se transfirieron a PBS 0.1 M (pH 7.4) hasta el montaje.

Para valorar la especificidad del marcaje algunas rebanadas se procesaron eliminando la incubación con el anticuerpo primario.

Después de la inmunocitoquímica los cortes se montaron en portaobjetos cubiertos con poli-lisina 0.01%, se dejaron secar y se sometieron a los procesos clásicos de deshidratación, aclaramiento y montaje, para su observación al microscopio compuesto.

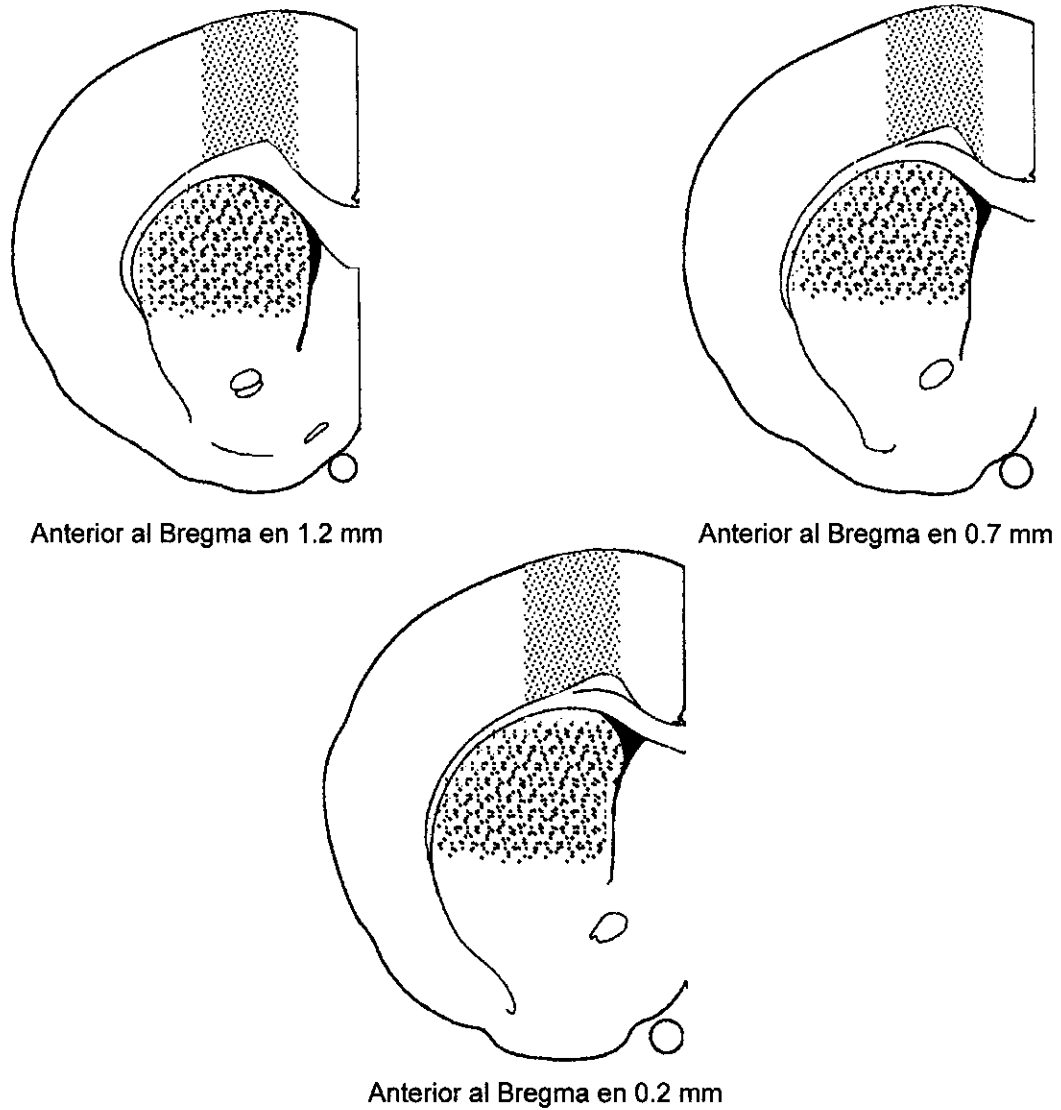
### **Cuantificación del número de células GABAérgicas.**

La densidad de las células GABAérgicas se evaluó en las preparaciones obtenidas de dos animales intactos, dos tratados con NaCl y tres con GMS de 60 días de edad. El conteo se realizó en un microscopio Leica DMLS acoplado a un sistema de cómputo que cuenta con el software LEICA Q500IW para el análisis de imágenes. Las dimensiones de los campos de observación fueron de 303.52  $\mu\text{m}$  X 236.02  $\mu\text{m}$  (71,636.79  $\mu\text{m}^2$ ) en el objetivo 20X. Para cada región se analizaron de 7-10 rebanadas por animal.

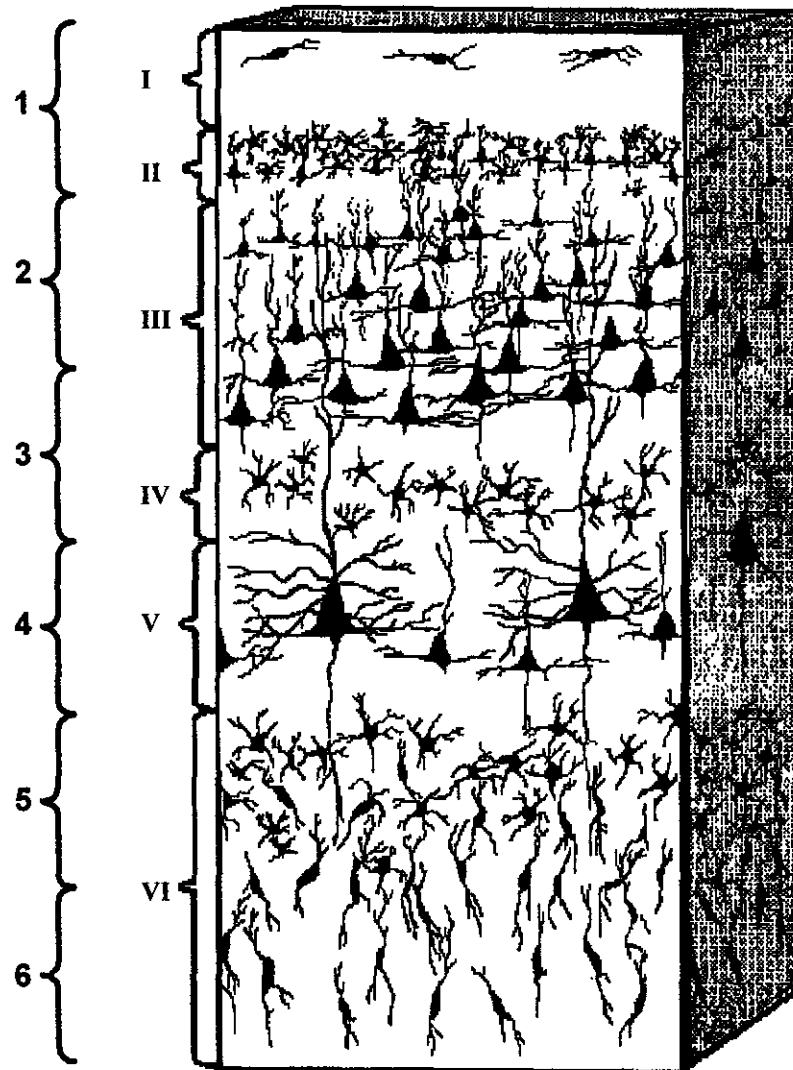
De cada región de interés se analizaron áreas que se conoce tienen alta densidad de células GABAérgicas y terminales glutamatérgicas, considerándose sólo a las células teñidas intensa y uniformemente que se encontraban completamente dentro del campo de observación.

Para la **corteza cerebral** el área analizada correspondió a la descrita por Watson y Paxinos (1986) (132) como los campos Fr1 y Fr2 de la corteza frontal de la rata (AP: 1.2-0.2mm; L: 0.7-3.2mm; en relación al Bregma) (Figura 11) (133). El conteo se realizó a través de todas las capas de la corteza cerebral en columnas de seis campos y de cada rebanada se analizaron seis columnas (Figura 12). En el **cuerpo estriado** se observaron 30 campos por rebanada del área superior del caudado putamen anterior (AP: 1.2-0.2mm; L: 1.0-3.6mm; V: 3.4-5.4mm; en relación al Bregma) (Figura 11) (132,134). Mientras que para el **hipocampo** se analizó el área correspondiente al hipocampo dorsal (4.8-5.8 mm rostrales a la línea interaural) (132) y se contabilizaron todas las células GABAérgicas tanto de la formación hipocámpal (CA1 y CA2-3) como del giro dentado (Figura 13) (135).

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media del número de células por campo para la corteza cerebral y el cuerpo estriado y por región para la formación hipocámpal (CA1 y CA2-3) y el giro dentado.

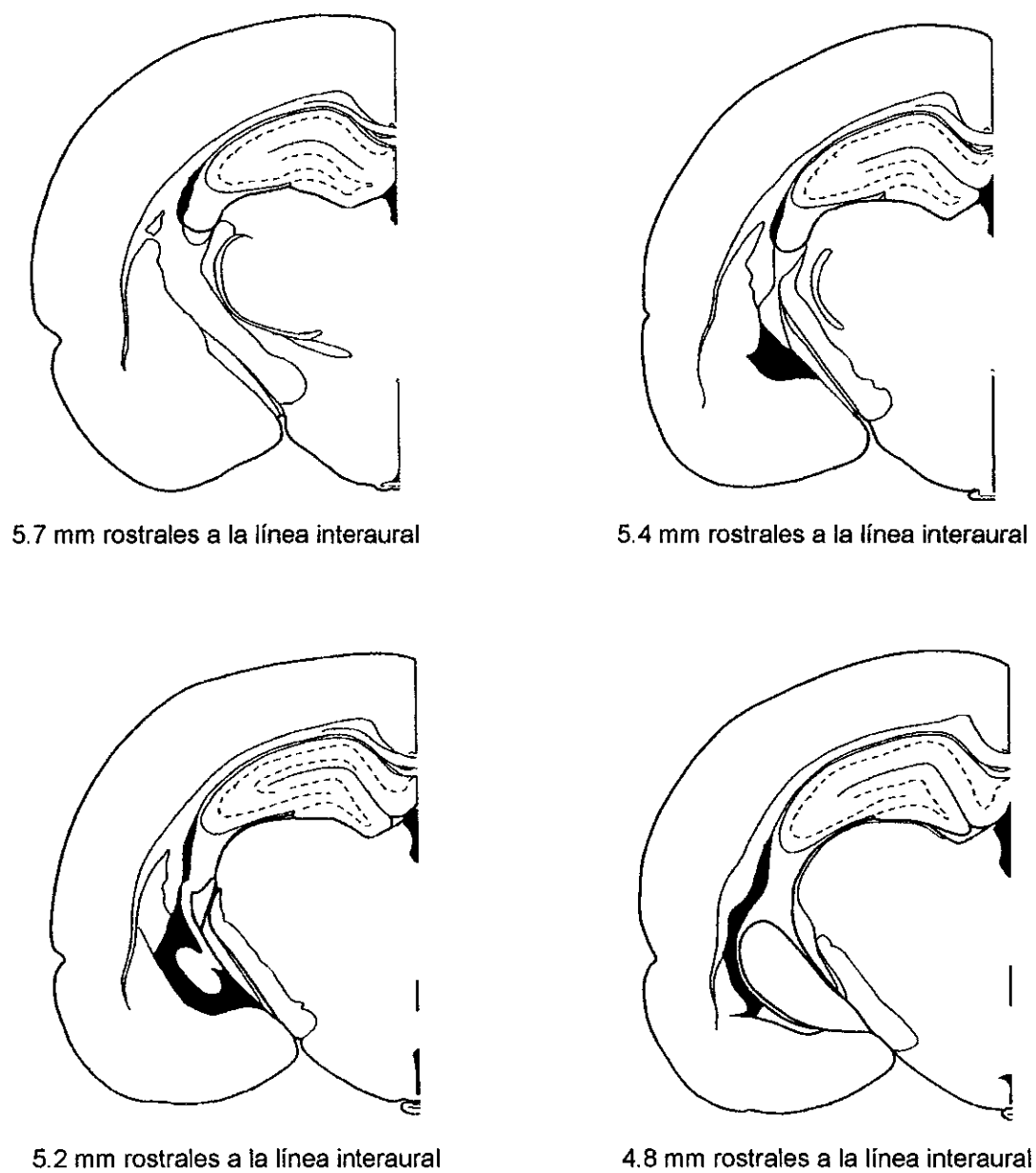


**FIGURA 11.** Cortes coronales de la corteza cerebral y el estriado de la rata. Las zonas sombreadas corresponden a las áreas en las cuales se determinó la densidad de las células GABAérgicas para cada región.



**FIGURA 12.** Histoarquitectura típica de la corteza cerebral. Los números romanos indican las diferentes capas corticales: I.Molecular; II.Granular externa; III.Piramidal externa; IV.Granular interna; V.Piramidal interna; y VI.De células polimórficas. En cambio los números arábigos indican el eje longitudinal (303.52  $\mu\text{m}$ ) de los campos de conteo en que se determinó la densidad de las células GABAérgicas





**FIGURA 13.** Cortes coronales del hipocampo de la rata. Muestran los niveles en que se determinó la densidad de las células GABAérgicas.

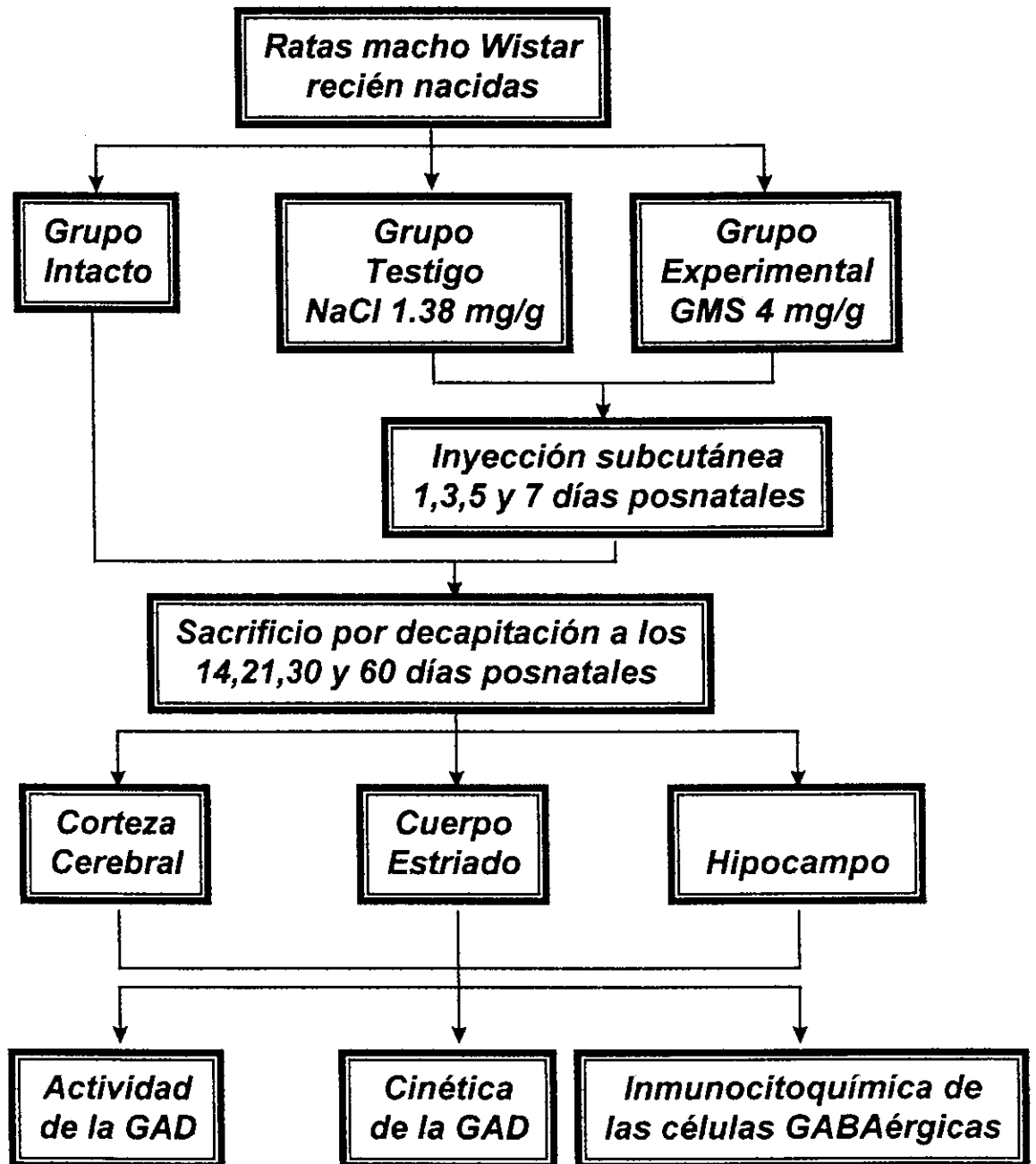
### **Análisis Estadístico de los resultados**

Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron mediante las pruebas estadísticas de ANOVA de una vía y t de Student, considerándose significativas aquellas con una  $p < 0.05$ .

### **Reactivos**

Todos los reactivos utilizados fueron de la mejor calidad disponible. Para la actividad de la GAD: la sacarosa y el ácido sulfúrico de la casa comercial J.T.Becker; el NaCl, el GMS, el fosfato de piridoxal, el hidróxido de benzetonio (Hyamina) y los reactivos para la determinación de proteínas de SIGMA; y el  $1\text{-}^{14}\text{C}\text{-L-glutamato}$  (45mCi/mmol) de NEN-DUPONT. Para la tinción inmunocitoquímica del GABA: el anticuerpo policlonal anti-GABA de conejo fue de SIGMA; el anticuerpo anti-IgG y el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC Kit, rabbit IgG) de Vector Laboratories; el paraformaldehído, el glutaraldehído, las sales para preparar los amortiguadores, la albúmina, el Tritón X-100, la poli-lisina y la resina para montaje de SIGMA; el etanol y el xilol de J.T. Becker.

## DIAGRAMA EXPERIMENTAL



## RESULTADOS

---

### Corteza Cerebral

La actividad de la GAD en el grupo intacto se elevó significativamente a los 21 días posnatales, incluso por arriba del doble en comparación con los 14 días posnatales. Sin embargo, a partir de los 30 días posnatales esa actividad se redujo a niveles inferiores (Figura 14).

El tratamiento neonatal con NaCl no produjo cambios significativos en la actividad de la GAD, en ninguna de las regiones o edades estudiadas (Figuras 14, 19 y 24). Por lo que las propiedades cinéticas de la GAD no fueron evaluadas en el grupo tratado con NaCl.

Por otro lado, el tratamiento neonatal con GMS redujo significativamente la actividad de la GAD a los 21 y 60 días posnatales, con respecto a ambos grupos control. Además, a los 30 días posnatales se observó una ligera recuperación en la actividad de la GAD por arriba de la observada en el grupo intacto, sin embargo esta elevación no fue estadísticamente significativa (Figura 14).

El aumento en la actividad de la GAD que se observó a los 21 días posnatales en el grupo intacto se asoció con un aumento en la  $V_{max}$  y en la afinidad de la enzima por el sustrato, en relación con los valores correspondientes a los 14 días posnatales (Tabla 2).

Las modificaciones producidas por el tratamiento neonatal con GMS sobre la actividad de la GAD también están relacionados con cambios en las propiedades cinéticas de la GAD. Así, a los 21 días posnatales se observó una disminución, tanto en la  $V_{max}$  como en la afinidad; mientras que a los 60 días posnatales se presentó un aumento en la  $V_{max}$  y una reducción en la afinidad (Tabla 2).

En los animales adultos intactos, la células GABAérgicas aparecen a lo largo de todas las capas corticales, sin embargo, su densidad por campo fue muy variable a lo largo de una columna y entre columnas, encontrando en algunos conteos, densidades celulares correspondientes a más del doble del valor promedio

reportado. De esta forma, el valor promedio de células GABAérgicas fue de 4 a 12 células por campo a lo largo de las columnas, encontrándose el valor menor en el campo 6 y el valor mayor en el campo 2. La morfología de las células GABAérgicas corticales es muy variada y las dimensiones del eje mayor del soma es desde aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta más de 20  $\mu\text{m}$  (Figuras 15, 16 y 18).

El tratamiento con GMS redujo la densidad de células GABAérgicas corticales y también modificó su distribución a lo largo de las columnas. Así, el campo de mayor densidad (10 células por campo) en los animales tratados con GMS correspondió al campo 1, mientras que en los demás campos la densidad celular fue significativamente menor con respecto a ambos grupos control (Figura 17-18).

Por otro lado, el tratamiento con NaCl también redujo la densidad celular en algunos campos (2, 4 y 6), sin embargo, esta disminución fue menor que la producida por el tratamiento con GMS (Figura 17-18).

### **Estriado**

La actividad de la GAD en el estriado también se incrementó a los 21 días posnatales en el grupo intacto, sin embargo esta elevación con respecto a los 14 días posnatales fue menor que la observada en la corteza cerebral (Figuras 14 y 19).

El tratamiento con GMS mantuvo elevada la actividad de la GAD, a lo largo de todas las edades estudiadas, sin embargo este aumento sólo fue significativo respecto a ambos grupos control a los 60 días posnatales (Figura 19), edad en la que parece asociarse con un aumento en la  $V_{\text{max}}$  y en la afinidad de la enzima por el sustrato (Tabla 3).

Por otro lado, la densidad de células GABAérgicas estriatales en los animales adultos intactos (9 células por campo), al igual que en la corteza cerebral varió a lo largo de los campos seleccionados desde 4 células en los campos de menor densidad hasta 16 células en los de mayor densidad. Sin embargo, a diferencia de lo observado en la corteza cerebral, todas las células GABAérgicas estriatales son pequeñas, ya que el eje mayor del soma mide aproximadamente entre 9 y 12  $\mu\text{m}$ .

Además, es importante señalar que la mayoría de estas células se encuentran en la cercanía de las lagunas estriatales (Figuras 20-23).

El tratamiento con NaCl no modificó significativamente la densidad de las células GABAérgicas estriatales, pero el tratamiento con GMS disminuyó la densidad celular por campo de manera significativa con respecto a ambos grupos control (Figura 22-23).

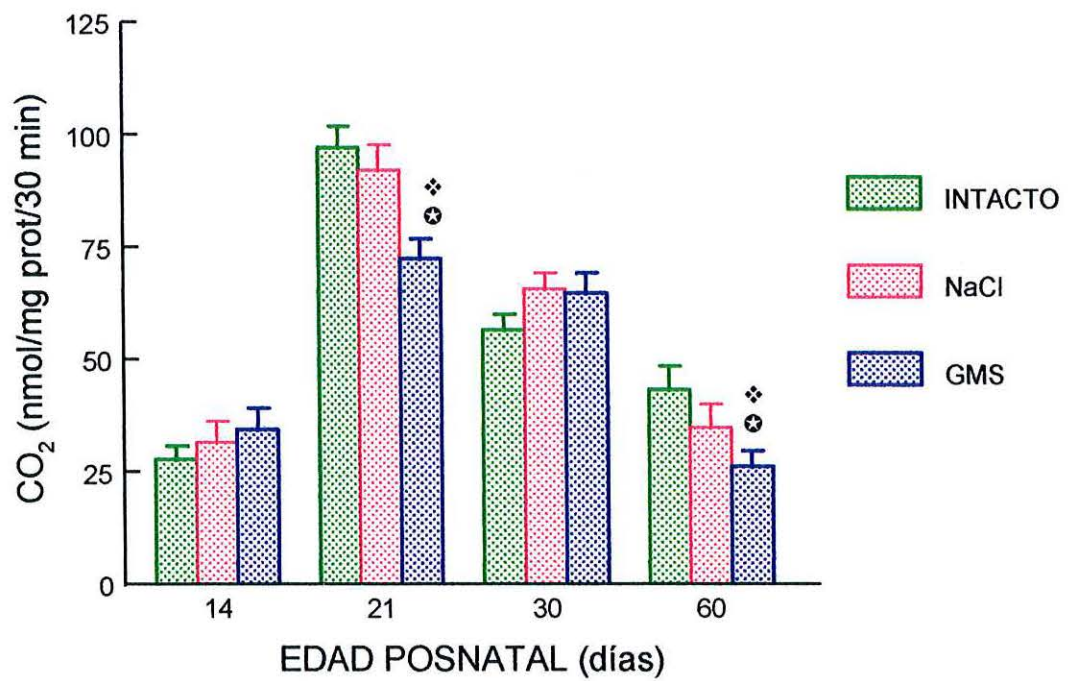
### **Hipocampo**

La actividad de la GAD en esta región tuvo un patrón similar al observado en el estriado, tanto para los animales intactos como para los tratados con GMS, en los cuales se elevó la actividad de la enzima, de manera significativa con respecto a ambos grupos control a los 60 días posnatales (Figura 24). El aumento en la actividad de la GAD ocasionado por el tratamiento con GMS se asocia con un aumento en la  $V_{max}$  y una disminución en la afinidad de la enzima por el sustrato (Tabla 4).

Las células GABAérgicas hipocámpales de animales adultos intactos son más abundantes en CA1 que en CA2-3 o en giro dentado; y se concentran fundamentalmente en los estratos piramidal, radiado y lacunoso-molecular, así como en la región hilar del giro dentado. La mayoría de las células GABAérgicas hipocámpales encontradas en el estrato piramidal son grandes y el eje mayor de su soma mide entre 15 y 25  $\mu\text{m}$ , lo mismo que algunas células de la capa molecular del giro dentado. Además, el soma de la mayoría de las células GABAérgicas del estrato piramidal tienen su eje mayor orientado perpendicularmente al de las células piramidales. Por otro lado, las células GABAérgicas del giro dentado son más pequeñas y el eje mayor de su soma apenas alcanza los 20  $\mu\text{m}$  (Figuras 25-28).

El tratamiento con GMS disminuyó significativamente la densidad de las células GABAérgicas tanto en CA1, como en CA2-3 y en giro dentado, con respecto a ambos grupos control. De igual forma, el tratamiento con NaCl también redujo la densidad de las células GABAérgicas en CA1 y en giro dentado, sin embargo, esta disminución fue menor que la producida con GMS (Figura 27-28).

**FIGURA 14. ACTIVIDAD DE LA GAD DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL DE LA CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA**



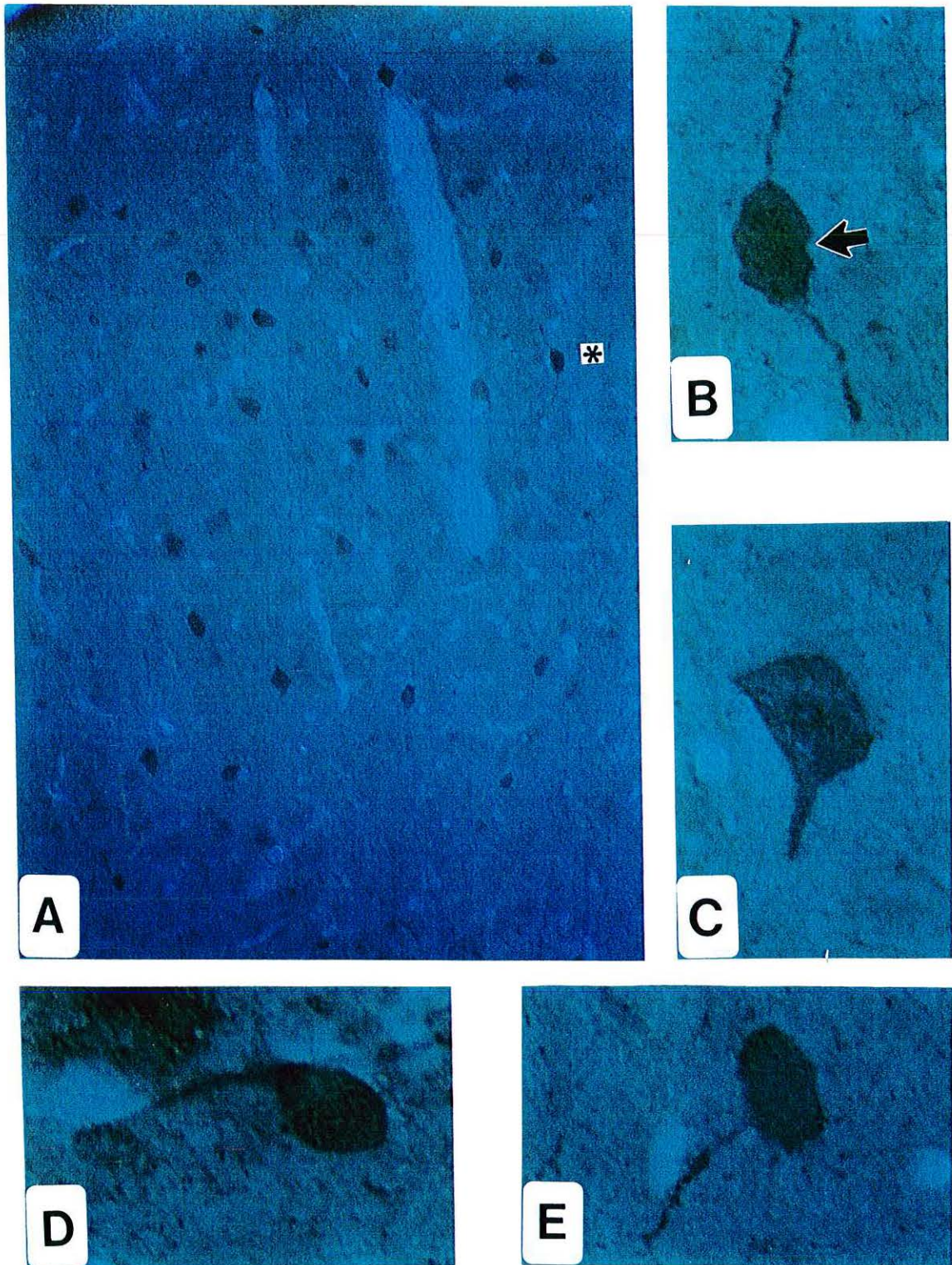
Los valores muestran la media  $\pm$  la desviación estándar de la media de 8-12 experimentos con determinaciones por triplicado. \* $p < 0.01$  GMS vs. INTACTO; y † $p < 0.05$  GMS vs. NaCl.

**TABLA 2. PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA GAD DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL DE LA CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA**

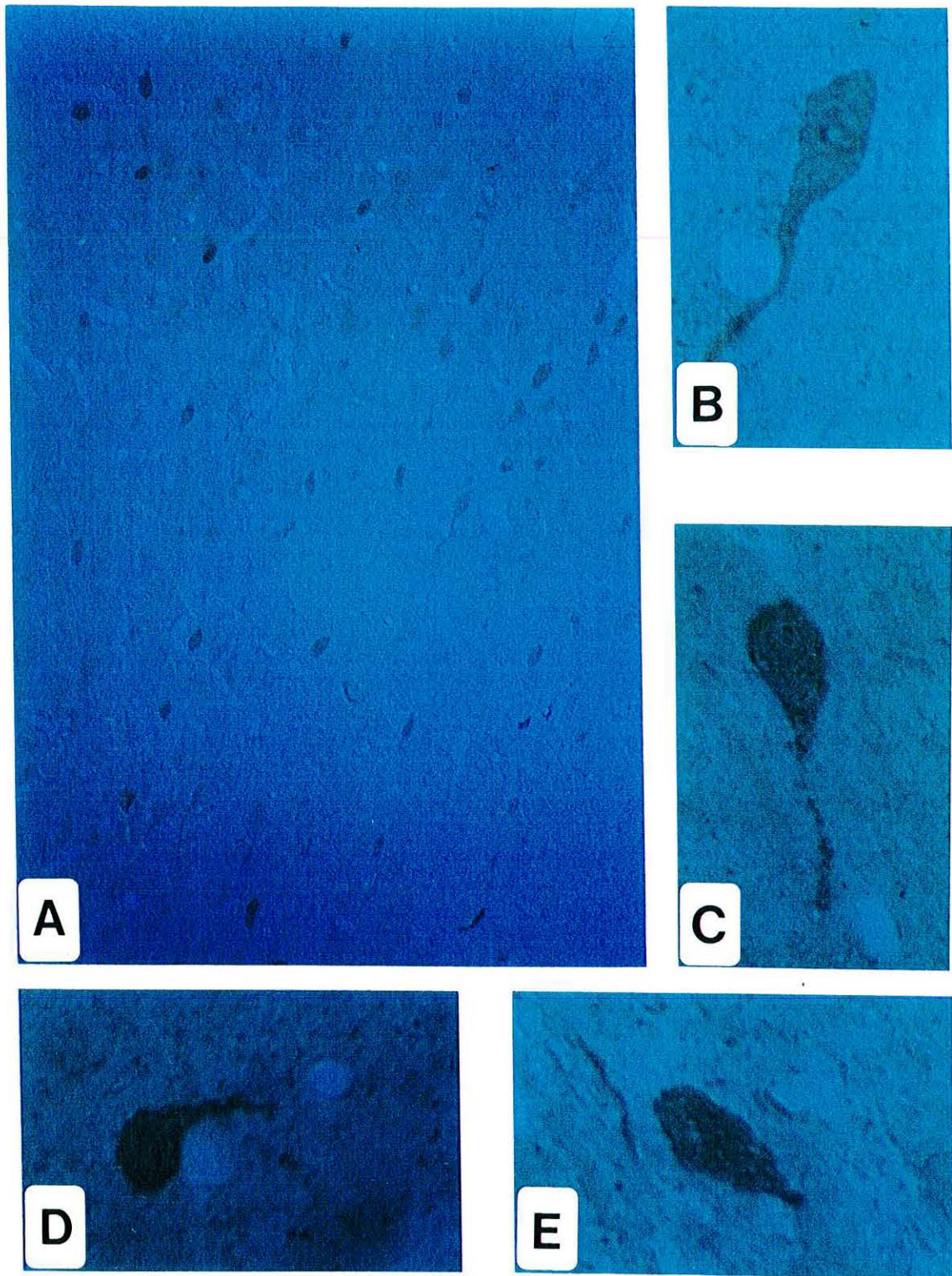
<b>EDAD POSNATAL</b>	<b>Vmax (nmol/mg prot/30min)</b>	<b>Km (mM)</b>
<b>14 DIAS</b>		
Intacto	68.59 ± 3.29	1.73 ± 0.10
GMS	63.07 ± 2.98	1.75 ± 0.12
<b>21 DIAS</b>		
Intacto	95.53 ± 2.49	1.38 ± 0.19
GMS	73.48 ± 1.89 †	1.98 ± 0.23 ‡
<b>30 DIAS</b>		
Intacto	77.99 ± 1.93	1.75 ± 0.09
GMS	75.49 ± 2.07	1.84 ± 0.25
<b>60 DIAS</b>		
Intacto	68.59 ± 1.56	1.82 ± 0.16
GMS	88.57 ± 2.09 ☆	2.63 ± 0.17 ‡

La cinética se realizó utilizando concentraciones de glutamato desde 0.75 hasta 20 mM. Los valores de Km y Vmax se obtuvieron mediante la transformación de dobles recíprocos de Lineaweaver-Burk y los valores representan la media ± la desviación estándar de la media de 3 experimentos con determinaciones por triplicado. ⊙ p<0.05; ‡ p<0.01; † p<0.005; y ☆ p<0.001.



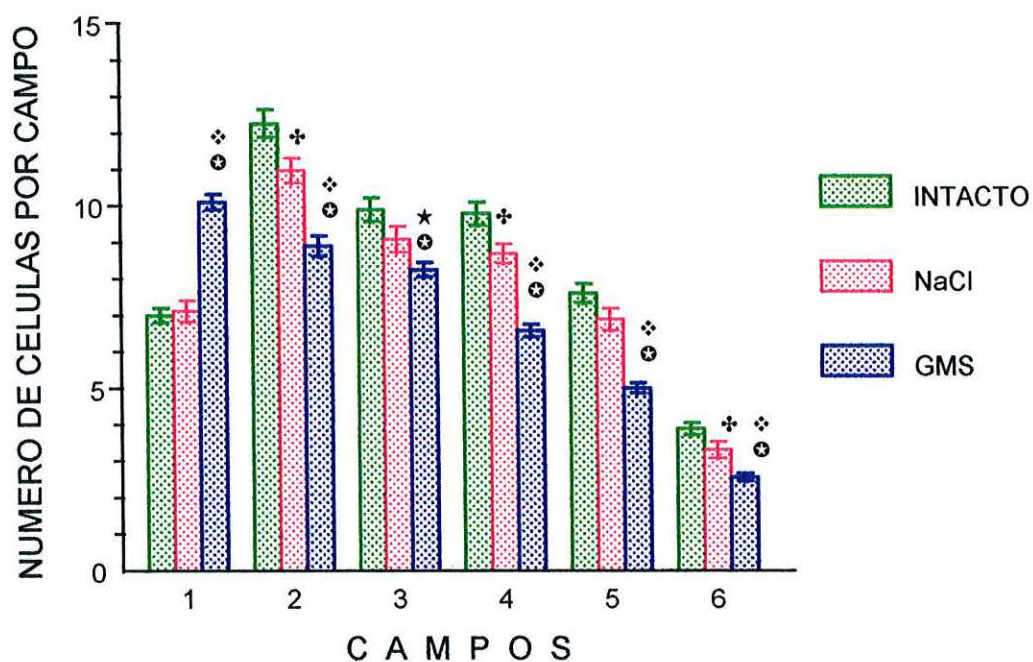


**FIGURA 15.** Células GABAérgicas de la corteza cerebral externa. **A.** Imagen general (250X) de la distribución y orientación de dichas células. **B-E.** Corresponden a imágenes de células GABAérgicas individuales (1250X). El asterisco señala la posición de las células que aparecen en **B** y la flecha indica los límites de las dos células. Las imágenes de las células individuales conservan la orientación en que aparecen a lo largo de las capas corticales.

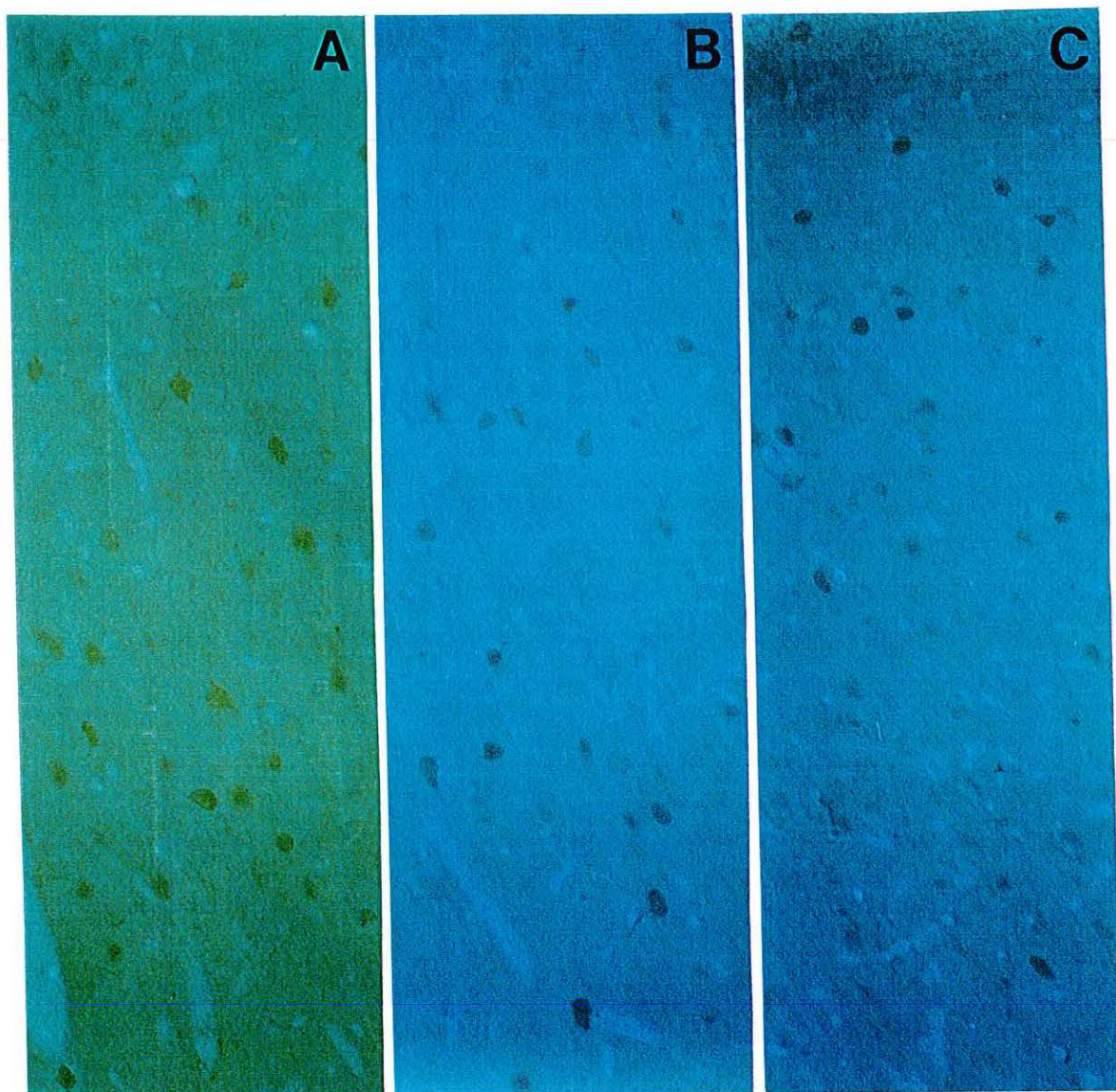


**FIGURA 16.** Células GABAérgicas de la corteza cerebral interna. **A.** Imagen general (250X) de la distribución y orientación de dichas células. **B-E.** Corresponden a imágenes de células GABAérgicas individuales (1250X), las cuales conservan la orientación en que aparecen a lo largo de las capas corticales.

**FIGURA 17. DENSIDAD DE CELULAS GABAérgicas CORTICALES EN EL CEREBRO DE RATAS ADULTAS**

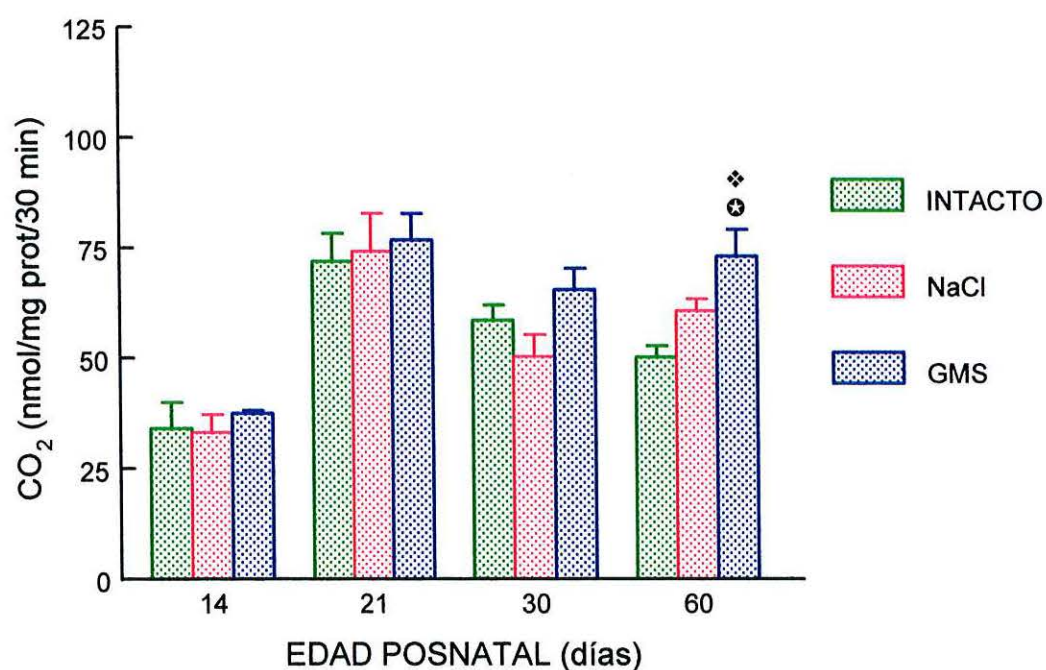


Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de 96 a 126 conteos para cada uno de los campos ( $236.02\mu\text{m} \times 303.52\mu\text{m}$ ;  $71,636.79\mu\text{m}^2$ ), los cuales se numeraron del 1 al 6 desde la superficie pial hasta el cuerpo calloso, dentro de una columna de  $236.02\mu\text{m}$  de ancho.  $\odot p < 0.001$  GMS vs. INTACTO;  $\clubsuit p < 0.05$  NaCl vs. INTACTO;  $\star p < 0.05$  GMS vs. NaCl; y  $\diamond p < 0.001$  GMS vs. NaCl.



**FIGURA 18.** Imágenes comparativas de las células GABAérgicas corticales de ratas adultas intactas (A), tratadas neonatalmente con NaCl (B) y con GMS (C). Las imágenes corresponden a la corteza cerebral externa (250X). Nótese que la distribución de las células es diferente en cada caso.

**FIGURA 19. ACTIVIDAD DE LA GAD DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL DEL ESTRIADO DE LA RATA**

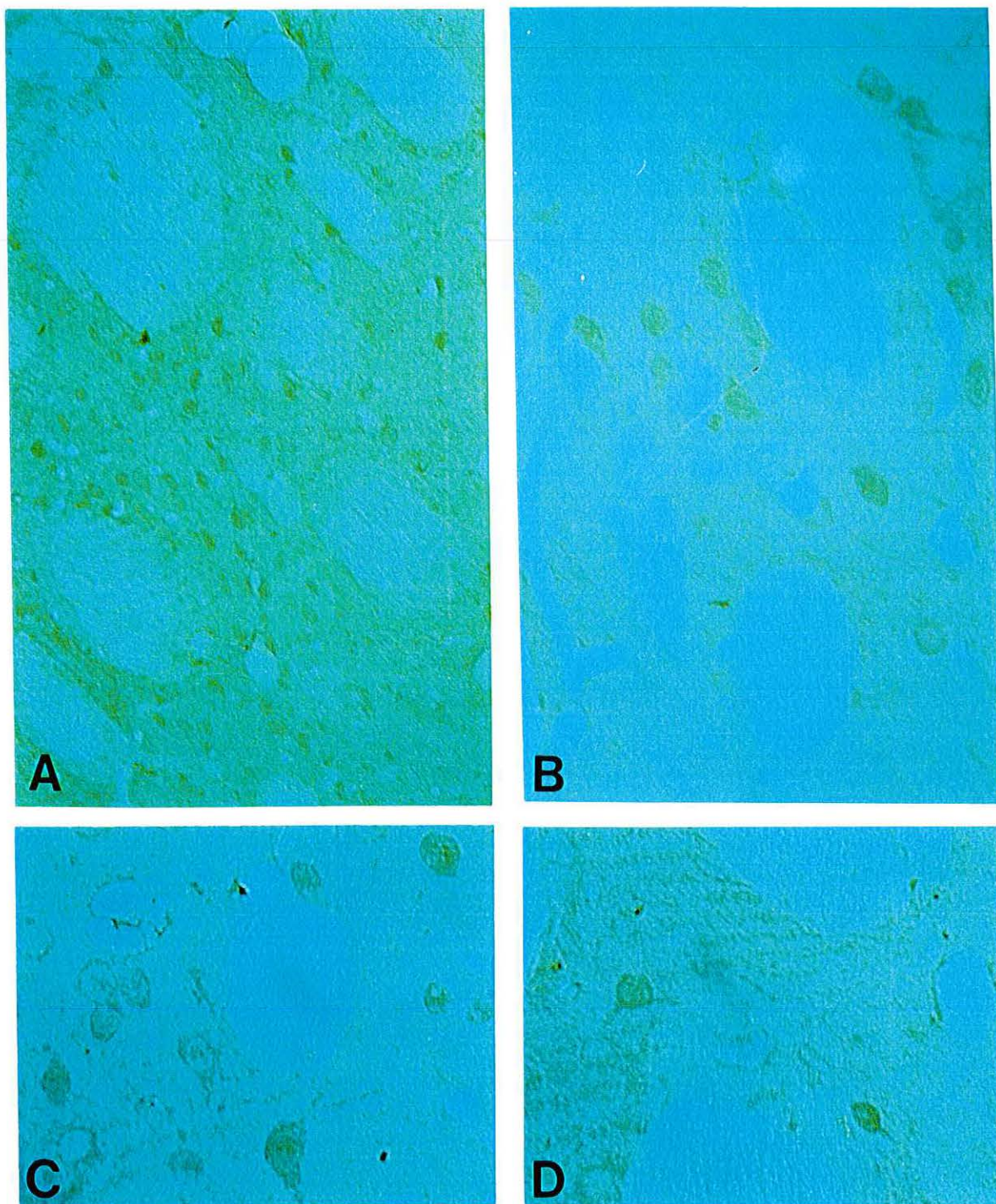


Los valores muestran la media  $\pm$  la desviación estándar de la media de 8-12 experimentos con determinaciones por triplicado.  $\odot p < 0.01$  GMS vs. INTACTO; y  $\diamond p < 0.05$  GMS vs. NaCl.

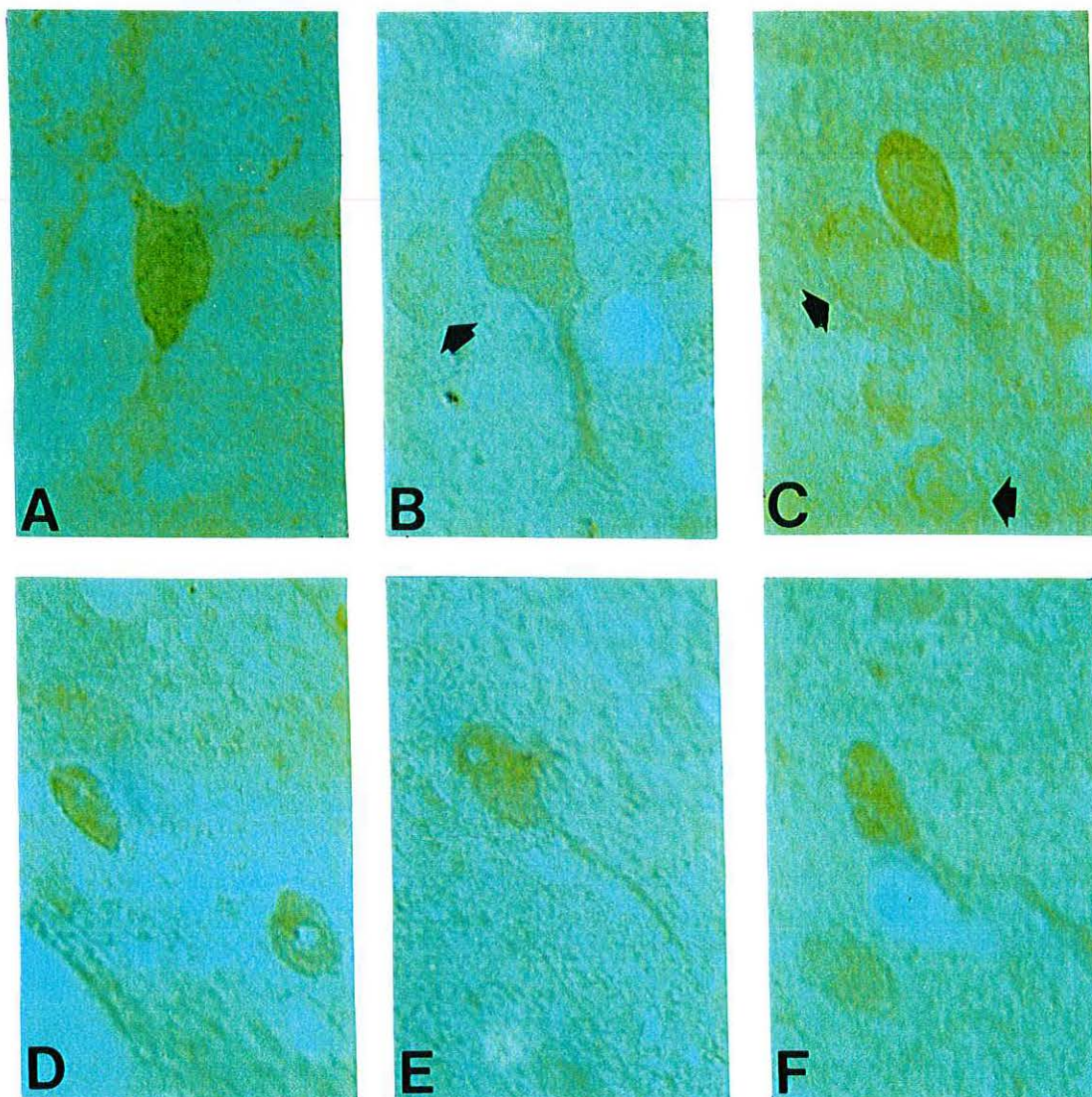
**TABLA 3. PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA GAD DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL DEL ESTRIADO DE LA RATA**

<b>EDAD POSNATAL</b>	<b>Vmax</b> (nmol/mg prot/30min)	<b>Km</b> (mM)
<b>14 DIAS</b>		
Intacto	83.03 ± 4.13	1.14 ± 0.09
GMS	78.12 ± 2.08	1.23 ± 0.08
<b>21 DIAS</b>		
Intacto	90.05 ± 3.99	1.39 ± 0.09
GMS	83.67 ± 2.97	1.45 ± 0.11
<b>30 DIAS</b>		
Intacto	101.6 ± 3.19	2.09 ± 0.07
GMS	103.3 ± 2.35	1.87 ± 0.14
<b>60 DIAS</b>		
Intacto	69.50 ± 2.82	1.83 ± 0.13
GMS	83.54 ± 3.18 ✦	1.58 ± 0.16 ✦

La cinética se realizó utilizando concentraciones de glutamato desde 0.75 hasta 20 mM. Los valores de Km y Vmax se obtuvieron mediante la transformación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk y los valores representan la media ± la desviación estándar de la media de 3 experimentos con determinaciones por triplicado. Ⓢ p<0.05; ✦ p<0.01; ✧ p<0.005; y ✨ p<0.001.



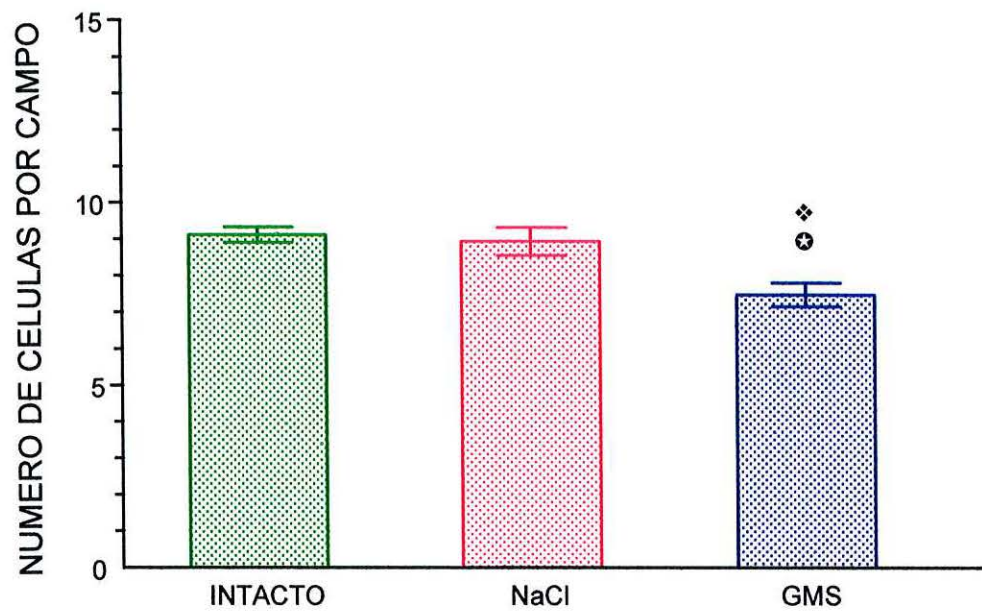
**FIGURA 20.** Células GABAérgicas estriatales. Las imágenes muestran la distribución y orientación de dichas células: **A.** (250X); **B-D.** (500X). Obsérvese que muchas células GABAérgicas se encuentran en los límites de las lagunas estriatales.



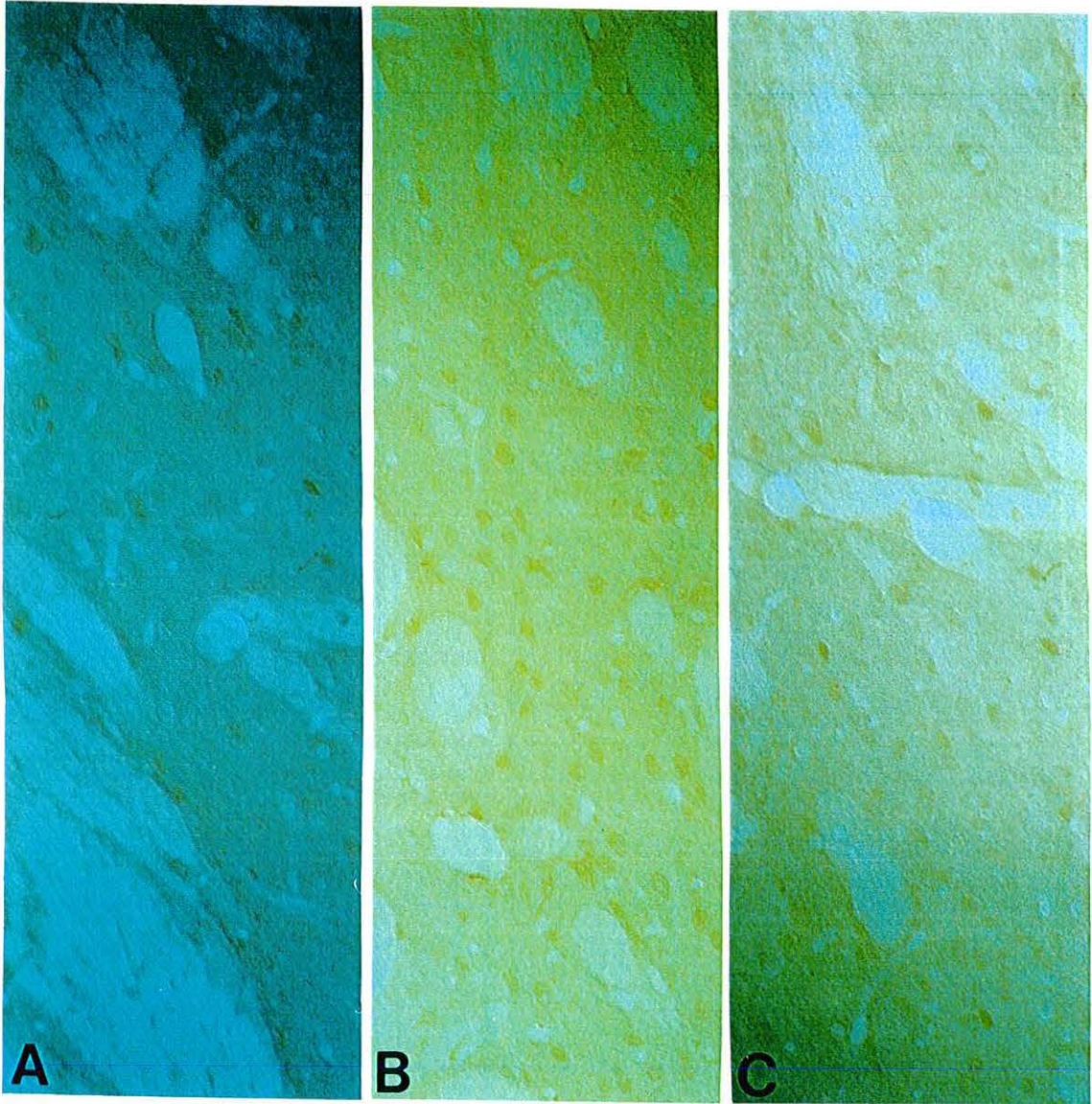
**FIGURA 21.** Células GABAérgicas estriatales. Las imágenes muestran la morfología y orientación de algunas células GABAérgicas del estriado (**A-F**; 1250X). Las flechas indican la presencia de células con poco marcaje, generalmente confinado a los límites del soma. Dichas células no se consideraron en las estimaciones de la densidad de las células GABAérgicas.



**FIGURA 22. DENSIDAD DE CELULAS GABAérgicas ESTRIATALES EN EL CEREBRO DE RATAS ADULTAS**

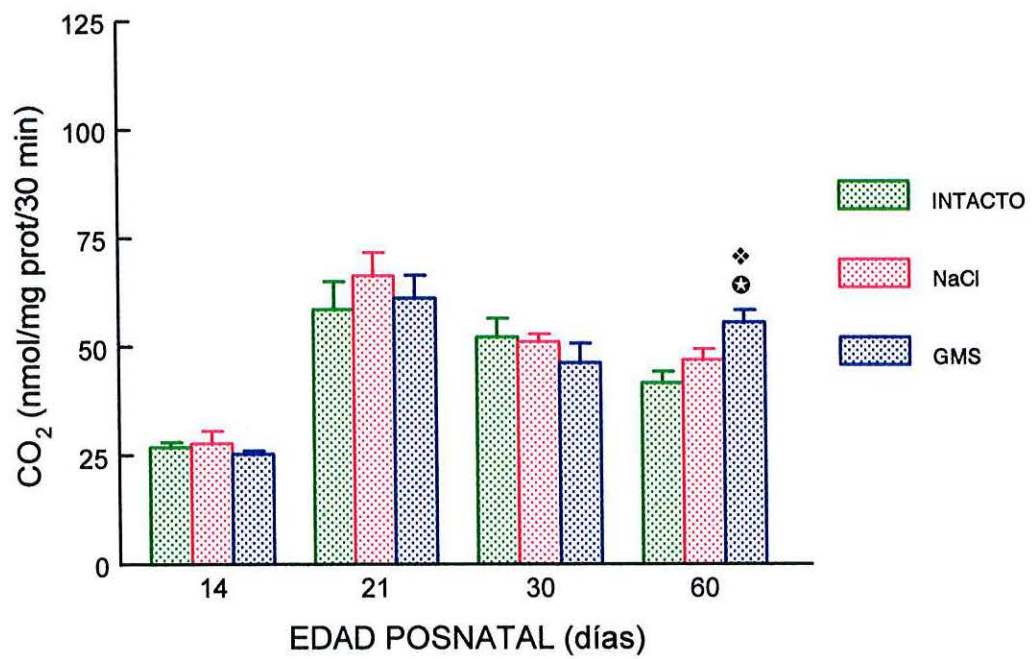


Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de 450 a 690 campos ( $236.02\mu\text{m} \times 303.52\mu\text{m}$ ;  $71,636.79\mu\text{m}^2$ ). ⊛ p<0.001 GMS vs. INTACTO; y ⊠ p<0.01 GMS vs. NaCl.



**FIGURA 23.** Imágenes comparativas de las células GABAérgicas estriatales de ratas adultas intactas (A), tratadas neonatalmente con NaCl (B) y con GMS (C) (250X).

**FIGURA 24. ACTIVIDAD DE LA GAD DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL DEL HIPOCAMPO DE LA RATA**

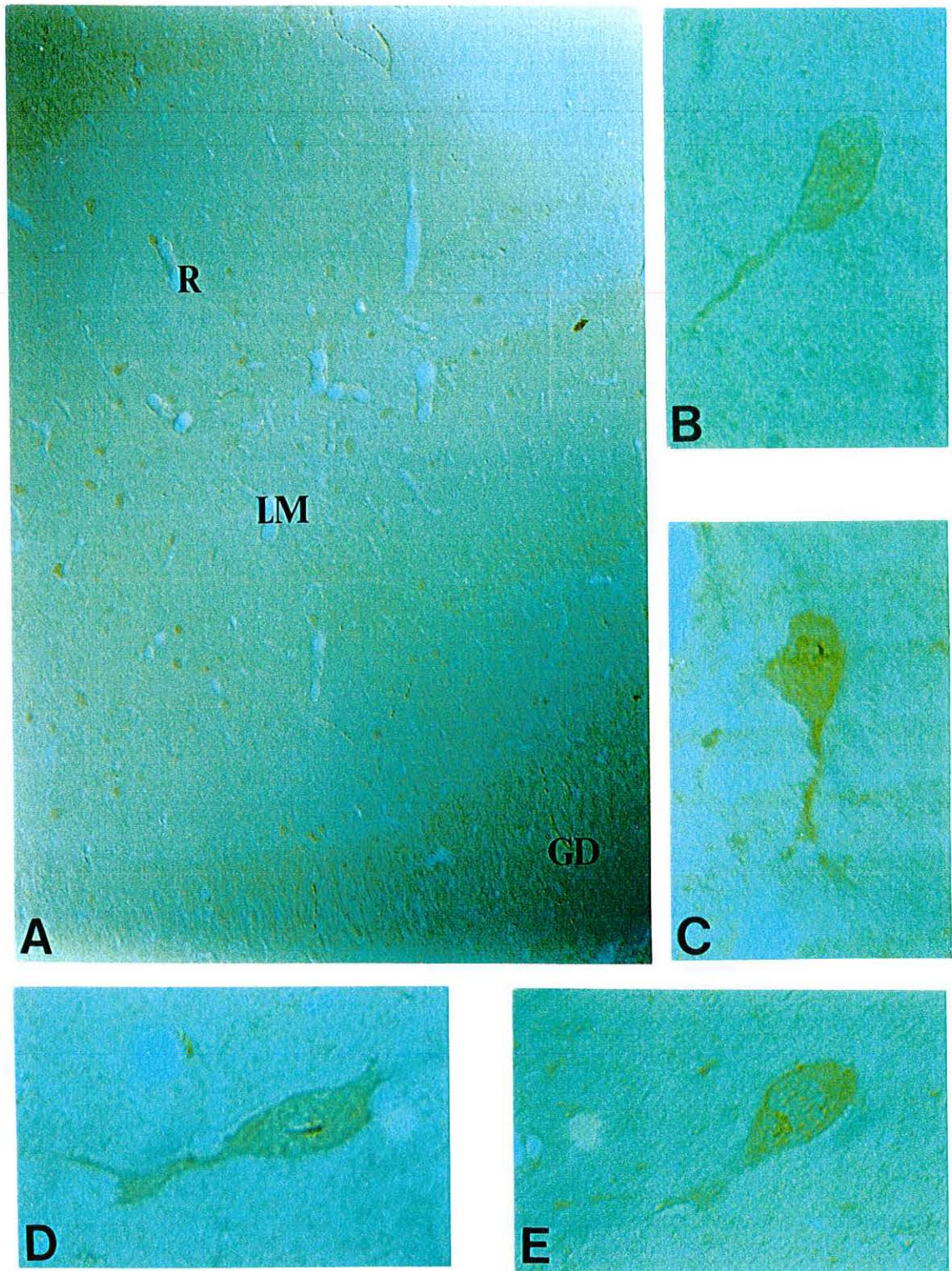


Los valores muestran la media  $\pm$  la desviación estándar de la media de 8-12 experimentos con determinaciones por triplicado.  $\oplus p < 0.005$  GMS vs. INTACTO; y  $\diamond p < 0.05$  GMS vs. NaCl.

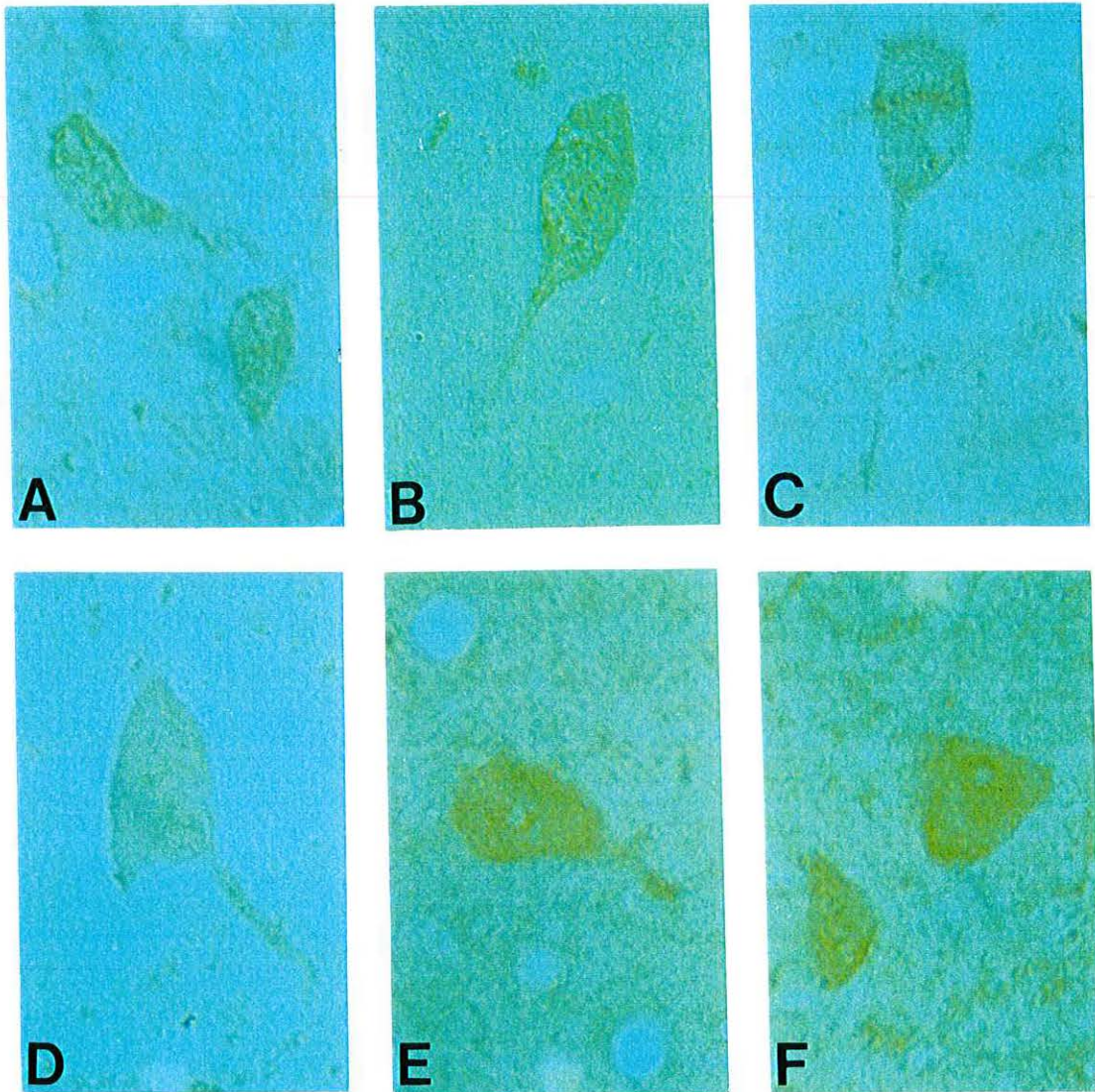
**TABLA 4. PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA GAD DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL DEL HIPOCAMPO DE LA RATA**

<b>EDAD POSNATAL</b>	<b>Vmax (nmol/mg prot/30min)</b>	<b>Km (mM)</b>
<b>14 DIAS</b>		
Intacto	60.12 ± 2.45	1.78 ± 0.19
GMS	58.13 ± 3.02	1.59 ± 0.13
<b>21 DIAS</b>		
Intacto	89.63 ± 2.97	2.03 ± 0.09
GMS	87.12 ± 2.33	1.93 ± 0.12
<b>30 DIAS</b>		
Intacto	87.79 ± 2.13	1.83 ± 0.13
GMS	95.12 ± 1.93 ⊕	2.59 ± 0.09 ⊕
<b>60 DIAS</b>		
Intacto	71.19 ± 1.63	1.79 ± 0.07
GMS	85.28 ± 2.07 ⊕	1.92 ± 0.16 ⊕

La cinética se realizó utilizando concentraciones de glutamato desde 0.75 hasta 20 mM. Los valores de Km y Vmax se obtuvieron mediante la transformación de dobles recíprocos de Lineaweaver-Burk y los valores representan la media ± la desviación estándar de la media de 3 experimentos con determinaciones por triplicado. ⊕ p<0.05; ⊖ p<0.01; ⊗ p<0.005; y ☆ p<0.001.

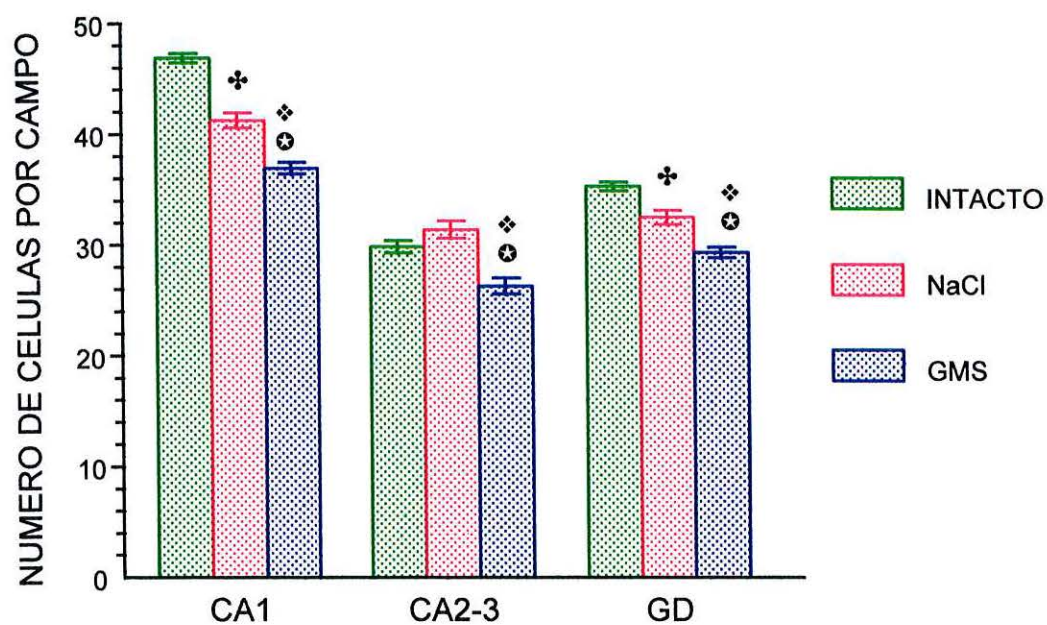


**FIGURA 25.** Células GABAérgicas hipocámpales. **A.** Imagen general de la distribución y orientación de algunas células GABAérgicas del hipocampo (125X). Obsérvese la concentración de dichas células en los estratos radiado (R) y lacunoso-molecular (LM), así como su presencia en el giro dentado (GD). **B-E.** Imágenes de células GABAérgicas hipocámpales (1250X) ubicadas en los estratos R y LM.

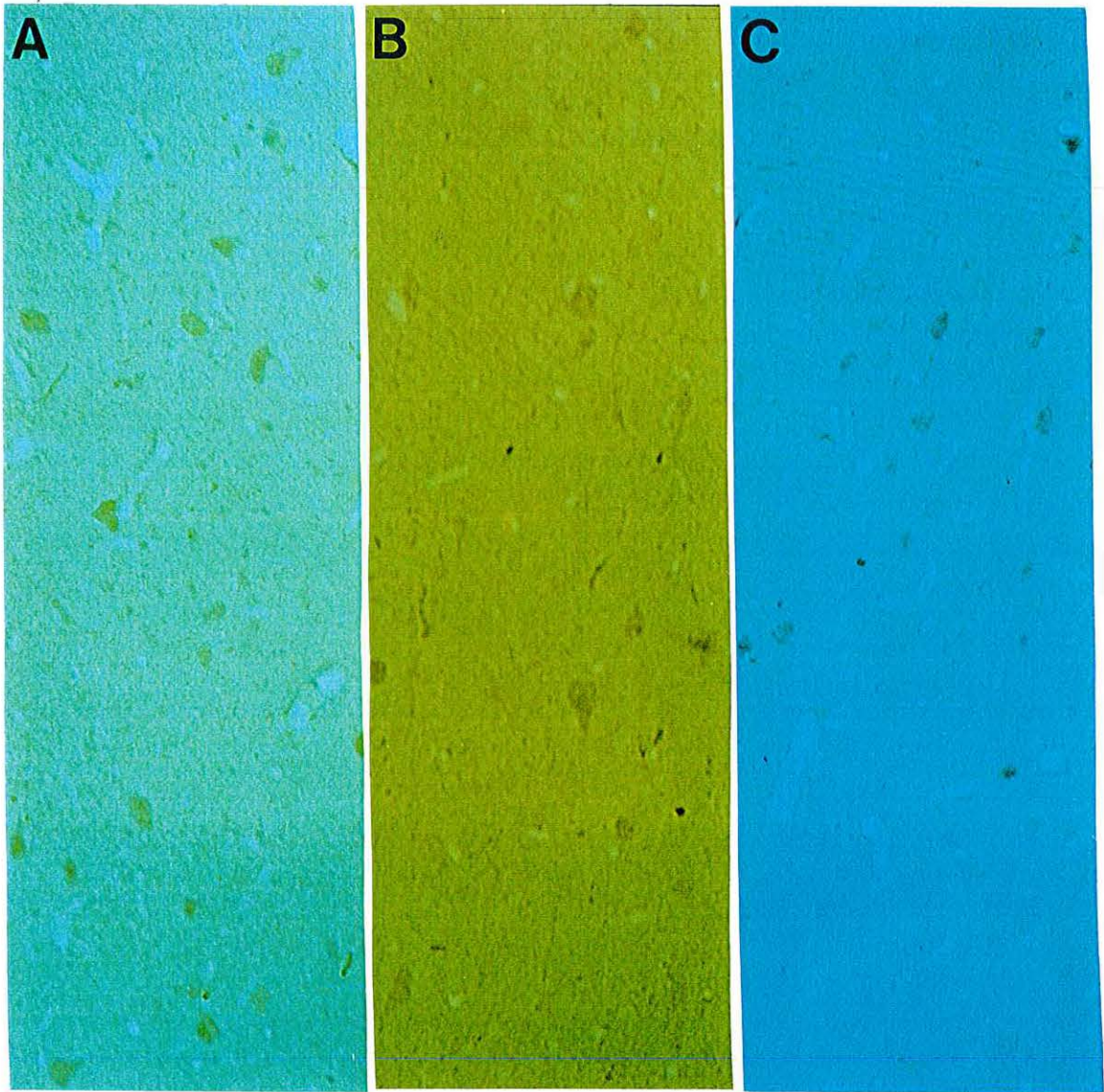


**FIGURA 26.** Imágenes individuales de las células GABAérgicas del hipocampo (1250X). Localizadas: en el estrato lacunoso-molecular (**A-C**); abajo y arriba del soma de las células piramidales (**D** y **E**, respectivamente); y en el hilus del giro dentado (**F**).

**FIGURA 27. DENSIDAD DE CELULAS GABAérgicas HIPOCAMPALES EN EL CEREBRO DE RATAS ADULTAS**



Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de los conteos de 17 a 29 rebanadas. ⊕ $p < 0.001$  GMS vs. INTACTO; \* $p < 0.001$  NaCl vs. INTACTO; y ⊕\* $p < 0.01$  GMS vs. NaCl.



**FIGURA 28.** Imágenes comparativas de las células GABAérgicas hipocámpales de ratas adultas intactas (A), tratadas neonatalmente con NaCl (B) y con GMS (C). Las imágenes corresponden a los estratos radiado, lacunoso-molecular y molecular del giro dentado en los límites de CA1 y CA2 (250X).



## DISCUSION

---

Durante el desarrollo posnatal del SN de la rata, el primer mes de vida es determinante para la maduración de los sistemas de neurotransmisión y el establecimiento de sinapsis funcionales definitivas (136). Así, aunque las neuronas GABAérgicas existen desde antes del nacimiento, su densidad y patrones de distribución finales se alcanzan después de la cuarta semana de vida (133). Al nacimiento, la concentración cerebral de GABA se encuentra por debajo de la mitad de los niveles encontrados en el adulto (137). En tanto que, la actividad de la GAD comienza a elevarse en los primeros días después del nacimiento y alcanza su pico máximo hacia el final de la tercera semana de vida, después de lo cual disminuye hasta llegar a los niveles normales del adulto (49,50,51,53). Estas observaciones son congruentes con los resultados obtenidos en este trabajo en los animales intactos, donde la actividad de la GAD mostró el patrón clásico de desarrollo descrito anteriormente, tanto para la corteza cerebral, como para el estriado y el hipocampo. El aumento en la actividad de la GAD que se observó a los 21 días posnatales en las regiones estudiadas de los animales intactos se acompañó de una elevación en la  $V_{max}$ , la cual según evidencias experimentales, puede deberse a un aumento en la expresión de ambas formas de GAD (133).

El tratamiento neonatal con GMS redujo la actividad de la GAD en la corteza cerebral (21 y 60 días posnatales), en tanto que en el estriado y en el hipocampo la elevó (60 días posnatales), significativamente respecto a ambos grupos testigo. En este sentido, diferentes evidencias experimentales han demostrado que la administración intracerebral de algunas neurotoxinas, como el ácido kaínico, el NMDA o el ácido quinolínico, promueve la muerte neuronal, al mismo tiempo que reduce la actividad de la GAD (111,112,138). Además, también se ha observado que después de la muerte neuronal inducida por algún episodio de isquemia cerebral (62), por la deafferentación sináptica (11) o por las crisis convulsivas (61), se eleva la actividad de la GAD, al parecer debido a un aumento en la expresión de la GAD<sub>67</sub>

(62,139,140). De esta forma, tanto la disminución como el aumento en la actividad de la GAD pueden ser el reflejo de algún cuadro neurodegenerativo. En este sentido, se conoce que las lesiones con ácido kaínico o por isquemia se relacionan inicialmente con una disminución en la actividad de la GAD, debido a la muerte de algunas neuronas GABAérgicas. Sin embargo, después de varias semanas de la lesión, la actividad de la GAD y la expresión de sus mensajeros se elevan significativamente en las neuronas que sobreviven ("resistentes"). Este mecanismo compensatorio ha sido observado tanto en la corteza cerebral (141,142), como en el estriado (143) y en el hipocampo (144,145), pero en nuestro estudio no parece ser evidente en la corteza cerebral, lo cual puede deberse a que el tratamiento neonatal con GMS provoca una pérdida de neuronas GABAérgicas mayor, o bien, a que los mecanismos compensatorios tardan más tiempo en establecerse en esta estructura cerebral. En tanto que en el estriado y en el hipocampo el aumento en la actividad de la GAD observado a los 60 días de edad puede ser el reflejo de dicho mecanismo compensatorio, el cual trata de mantener la neurotransmisión inhibitoria GABAérgica.

Para comprobar si después del tratamiento neonatal con GMS se alteraba la sobrevivencia de las neuronas GABAérgicas, se realizó la inmunocitoquímica anti-GABA en las regiones de interés de ratas adultas. Así, los patrones de la distribución de las células GABAérgicas que se observaron en la corteza cerebral (49,133), el estriado (134) y el hipocampo (135) de animales intactos, corresponden con los descritos anteriormente, por otros autores, a través de estudios inmunocitoquímicos para el GABA y la GAD, así como de hibridación *in situ* para los mensajeros de la GAD. Por otro lado, los valores obtenidos para la densidad de las células GABAérgicas en animales intactos son un poco diferentes a los reportados en la literatura, sin embargo, existe una gran variabilidad entre cada corte, tal y como lo han citado otros autores (135), por esa razón se utilizó un número grande de campos de conteo, tratando así, de acercarse lo más posible a los valores reales.

El tratamiento neonatal con GMS modificó los patrones de distribución para la corteza cerebral y disminuyó la densidad de las células GABAérgicas en las tres regiones estudiadas de ratas adultas. En este sentido, se conoce que desde el

nacimiento las células GABAérgicas poseen receptores para Glu (R-Glu) (146) y que durante las dos primeras semanas de vida, la excitación sináptica mediada por Glu tiene mayor duración (147), condiciones que favorecerían la susceptibilidad de las células GABAérgicas al tratamiento neonatal con GMS. Además, la expresión de los R-Glu se eleva durante los primeros días de vida y alcanza su pico máximo entre los 14 y 28 días posnatales (148), etapa en la que intervienen en los procesos de diferenciación, migración y sobrevivencia neuronal del desarrollo posnatal del cerebro de la rata (137,146). Por lo que, la sobreactivación de los R-Glu, generada por el tratamiento neonatal con GMS podría alterar la migración de las células GABAérgicas corticales y promover su muerte en las tres regiones estudiadas. En este sentido, se ha demostrado que el proceso de diferenciación laminar de la corteza cerebral, que se inicia durante la primera semana de vida, puede ser modificado por agonistas y antagonistas glutamatérgicos (149,150). Además, también se ha observado que durante el desarrollo normal del cerebro el incremento en la expresión de R-KA, que se inicia en la primera semana de vida, se asocia con los procesos de regresión axonal y muerte neuronal que suceden durante la sinaptogénesis para el establecimiento de sinapsis definitivas (151). Por lo que estos procesos podrían iniciarse erróneamente debido al tratamiento neonatal con GMS.

Por otro lado, la muerte de neuronas GABAérgicas generada por el tratamiento neonatal con GMS en las primeras etapas del desarrollo posnatal, también alteraría el patrón de diferenciación y migración celular de la corteza cerebral, debido a que durante las etapas tempranas del desarrollo posnatal del cerebro, el GABA tiene efectos tróficos e interviene en la modulación de esos procesos (137,146). Además, recientemente se ha demostrado que durante los primeros cinco días de edad posnatal, la activación de los R-GABA<sub>A</sub> eleva la concentración intracelular de Ca<sup>++</sup> y favorece la activación de los R-NMDA, al eliminar el bloqueo sensible a voltaje que ejerce el Mg<sup>++</sup> (152). Normalmente la despolarización GABAérgica tiene un efecto trófico (153), sin embargo, el sinergismo de ambos receptores durante el tratamiento neonatal con GMS puede elevar

excesivamente la concentración intracelular de  $Ca^{++}$ , alterar los patrones normales de desarrollo y promover la muerte de otros tipos neuronales.

Así, los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran que el tratamiento neonatal con GMS modifica los patrones de desarrollo del sistema de neurotransmisión GABAérgico en la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo, específicamente alterando la actividad de la GAD, el patrón de distribución y la densidad de células GABAérgicas. Además, en trabajos previos se observó que el tratamiento neonatal con GMS eleva significativamente la liberación de [ $^3H$ ]-GABA estimulada por  $K^+$  en la corteza cerebral, en tanto que en el estriado y en el hipocampo se reduce a los 60 días posnatales, con respecto a ambos grupos testigo (123). Debido a que la liberación de [ $^3H$ ]-GABA depende de la eficiencia con que las neuronas GABAérgicas recapturan al GABA, se sugiere que las neuronas corticales GABAérgicas que sobreviven a los efectos tóxicos del GMS, podrían expresar más transportadores neuronales para GABA y/o exhibir mayor afinidad en la recaptura del neurotransmisor (123,154), de esta forma capturarían más [ $^3H$ ]-GABA y por lo tanto, bajo el mismo estímulo despolarizante, lo liberarían en mayor cantidad. En tanto que en el estriado y en hipocampo, es probable que la recaptura de GABA también se eleve, sin embargo, pareciera que las neuronas GABAérgicas que sobreviven a los efectos excitotóxicos del GMS, no responden eficientemente a la despolarización (123).

Los resultados sugieren que el sistema GABAérgico es susceptible al tratamiento neonatal con GMS, sin embargo, son necesarios otros estudios que permitan esclarecer la existencia de los mecanismos de plasticidad que se proponen en este trabajo. Por lo que, en este momento se realizan estudios para evaluar los efectos del tratamiento neonatal con GMS sobre la recaptura de [ $^3H$ ]-GABA y sobre los patrones de expresión de la GAD<sub>65</sub> y la GAD<sub>67</sub> en las mismas regiones.

Las modificaciones observadas en la neurotransmisión GABAérgica, indican que los animales adultos tratados neonatalmente con GMS pueden ser más susceptibles a presentar crisis convulsivas o a desarrollar padecimientos neurodegenerativos. En este sentido, se ha demostrado, que una disminución en la

neurotransmisión GABAérgica, como la que se presenta en animales deficientes en vitamina B<sub>6</sub>, conduce a la aparición espontánea de crisis convulsivas (54). Además, se ha propuesto que el GABA puede actuar como agente protector en los procesos degenerativos generados por algunas excitotoxinas (13,55,56); y también, se ha observado que la pérdida de neuronas GABAérgicas está asociada con algunas enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la enfermedad de Huntington (60,112).

Por otro lado, es posible que otros tipos neuronales (dopaminérgicos, glutamatérgicos, peptidérgicos, etc.) también degeneren después del tratamiento neonatal con GMS, ya que diferentes evidencias experimentales, han demostrado que las lesiones causadas por agonistas glutamatérgicos son muy extensas y que pueden afectar a más regiones cerebrales de las estudiadas (108,110,122). Además, recientemente se ha confirmado la presencia de R-Glu en células de astroglia y microglia (155). Por lo que, en este momento se realizan estudios para determinar los efectos del tratamiento neonatal con GMS sobre la densidad, distribución y morfología de las células gliales, así como, en el establecimiento del sistema dopaminérgico.

Además, el tratamiento neonatal con GMS modifica los patrones de unión de [<sup>3</sup>H]-Glu (125) y [<sup>3</sup>H]-KA (126) en diferentes regiones cerebrales durante el desarrollo posnatal y eleva la expresión las subunidades NR1 y GluR2,4 de los R-NMDA y R-AMPA, respectivamente (156,157). Estas modificaciones, podrían elevar la susceptibilidad de las neuronas al efecto excitotóxico del GMS, pero también podrían ejercer algún efecto neuroprotector, por lo que son necesarios más estudios para caracterizar las consecuencias fisiológicas de dichas modificaciones.

Finalmente, es importante mencionar que aunque el tratamiento neonatal con NaCl no modificó la actividad de la GAD en ninguna de las edades ni las regiones cerebrales estudiadas, si redujo la densidad de las células GABAérgicas en algunos campos de la corteza cerebral, así como en CA1 y giro dentado. Esto sugiere que algunas células GABAérgicas pueden degenerar debido a los procesos inflamatorios iniciados por altas concentraciones del NaCl, los cuales producen necrosis tisular en

diferentes tejidos (158). Además, se ha demostrado que el tratamiento neonatal con NaCl reduce la liberación de [ $^3\text{H}$ ]-GABA estimulada por  $\text{K}^+$  a los 14 y 21 días de edad en las tres regiones estudiadas para después normalizarse hacia los 60 días de edad (123). Por lo que, es posible que los cambios en el volumen celular producidos por la hiperosmolaridad del tratamiento neonatal con NaCl, alteren el contenido iónico celular y por lo tanto, la capacidad de responder a un estímulo despolarizante por  $\text{K}^+$ , durante los primeros quince días después del tratamiento.

## CONCLUSIONES

---

1. El tratamiento neonatal con GMS reduce la densidad de las células GABAérgicas en la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo de ratas adultas (60 días posnatales); lo que sugiere que dichas células son susceptibles a degenerar a través de la excitotoxicidad generada por el Glu en etapas tempranas del desarrollo.
2. En la corteza cerebral, la disminución de la densidad de las células GABAérgicas inducida por el tratamiento neonatal con GMS, se asocia con una disminución en la actividad total de la GAD y en la afinidad de la enzima por el sustrato, lo que sugiere que las células GABAérgicas afectadas pueden ser neuronas.
3. La pérdida de células GABAérgicas estriatales e hipocámpales, inducida por el tratamiento neonatal con GMS, se acompaña de un aumento en la actividad total de la GAD y en la  $V_{max}$  de la enzima, lo cual puede deberse a una mayor expresión del mensajero de  $GAD_{67}$ , mecanismo compensatorio que ha sido observado en otros cuadros neurodegenerativos.
4. El tratamiento neonatal con NaCl no modifica la actividad de la GAD en ninguna de las regiones ni edades estudiadas, sin embargo, reduce la densidad de células GABAérgicas en los campos corticales 2, 4 y 6, así como en el hipocampo (CA1 y giro dentado) lo que sugiere que algunas de estas células son susceptibles a degenerar por los procesos inflamatorios inducidos por el NaCl en etapas tempranas del desarrollo.

## BIBLIOGRAFIA

---

1. López-Antúnez L. (1983) "Anatomía funcional del sistema nervioso", *LIMUSA*, México, p.p. 5-8.
2. Noback C.R. y Demarest R.J. (1980) "Sistema Nervioso Humano. Fundamentos de Neurobiología", *McGraw-Hill*, México, p.p. 33-34.
3. Siegel G., Agranoff B., Albers B.W. y Malinoff P. (1989) "Basic Neurochemistry", 4a. ed., *Raven Press*, New York, p.p. 7-8
4. Gilman S. y Winans S.S. (1984) "Lo esencial en neuroanatomía y neurofisiología de Manter y Gatz", *Manual Moderno*, México, p.p. 4-5.
5. Pasantes H., Sánchez J. y Tapia R. (1991) "Neurobiología Celular", *SEP/FCE*, México, p.p. 167-180.
6. Tapia R. (1983) "El ácido  $\gamma$ -aminobutírico" En: *Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas* (Pasantes-Morales H. y Aréchiga H., eds.), UNAM, México, p.p. 57-70.
7. Wu J.Y. (1983) "Immunocytochemical identification of GABAergic neurons and pathways" En: *Glutamine, glutamate and GABA in the Central Nervous System* (Hertz L., Kvamme E., McGeer E.G. y Schousboe A., eds.), Liss, New York, p.p. 161-176.
8. Ribak C.E. y Roberts R.C. (1990) "GABAergic synapses in the brain identified with antisera to GABA and its synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase" *J. Elec. Microsc. Tech.* 15:34-48.
9. Rétaux S., Julien J.F., Besson M.J. y Penit-Soria J. (1992) "Expression of GAD mRNA in GABA interneurons of the rat medial frontal cortex" *Neurosci. Lett.* 136:67-71.
10. Feldum S., Erlander M.G. y Tobin A.J. (1993) "Different distributions of GAD<sub>65</sub> and GAD<sub>67</sub> mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles" *J. Neurosci. Res.* 34:689-706.
11. Carlsson M. y Carlsson A. (1990) "Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within of the nigrostriatal pathway alter the expression of



- glutamate decarboxylase messenger RNA in rat globus pallidus projection neurons" *Neuroscience* 13(7):72-76.
12. Kincaid A.E., Albin R.L., Newman S.W., Penny J.B. y Young A.B. (1992) "6-Hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway alter the expression of glutamate decarboxylase messenger RNA in rat globus pallidus projection neurons" *Neuroscience* 51(3):705-718.
  13. Moffet J.R., Palkovits M., Namboodiri M.A.A. y Neale J.H. (1994) "Comparative distribution of N-acetylaspartylglutamate and GAD<sub>67</sub> in the cerebellum and paracerebellar nuclei of the rat utilizing enhanced carboimide fixation and immunohistochemistry" *J. Comp. Neurol.* 347:598-618.
  14. Martin D.L. y Rinvall K. (1993) "Regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis in the brain" *J. Neurochem.* 60:395-407.
  15. Abe T. y Matsuda M. (1992) "Developmental change of the enzyme activity oxidizing  $\gamma$ -aminobutyraldehyde to  $\gamma$ -aminobutyric acid in the chick embryonic brain" *Neurochem. Res.* 17(3):297-299.
  16. Erlander M.G. y Tobin A.J. (1991) "The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review" *Neurochem. Res.* 16(3):215-226.
  17. Legay F., Henry S. y Tappaz M. (1987) "Evidence for two distinct forms of native glutamic acid decarboxylase in rat brain soluble extract: an immunoblotting study" *J. Neurochem.* 48:1022-1026.
  18. Kaufman D.L., Houser C.R. y Tobin A.J. (1991) "Two forms of the GABA synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions" *J. Neurochem.* 56:720-723.
  19. Denner L.A. y Wu J.Y. (1985) "Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate" *J. Neurochem.* 44:957-965.
  20. Covarrubias M. y Tapia R. (1980) "Brain glutamate decarboxylase: properties of its calcium-dependent binding to liposomes and kinetics of the bound and the free enzyme" *J. Neurochem.* 34:1682-1688.
  21. Erlander M.G., Tillakaratne N.J.K., Feldum S., Patel N. y Tobin A.J. (1991) "Two genes encode distinct glutamate decarboxylases" *Neuron* 7:91-100.

22. Bain G., Ramkumar T.P., Cheng J.M. y Gottlieb D.I. (1993) "Expression of the genes coding for glutamic acid decarboxylase in pluripotent cell lines" *Mol. Brain Res.* 17:23-30.
23. Bayon A., Possani L.D., Tapia M. y Tapia R. (1977) "Kinetics of brain glutamate decarboxylase interactions with glutamate, pyridoxal 5-phosphate and glutamate-pyridoxal-5-phosphate Schiff base" *J. Neurochem.* 29:519-525.
24. Martin D.L., y Barke K.E. (1998) "Are GAD<sub>65</sub> and GAD<sub>67</sub> associated with specific pools of GABA in brain?" *Respect. Dev. Neurobiol.* 5:119-129.
25. McLaughlin B.J., Wood J.G., Saito K., Roberts E. y Wu J.Y. (1975) "The fine structural localization of glutamate decarboxylase in developing axonal processes and presynaptic terminals of rodent cerebellum" *Brain Res.* 85:355-371.
26. Martin D.L. y Martin S.B. (1982) "Effect of nucleotides and other inhibitors on the activation of glutamate decarboxylase" *J. Neurochem.* 39:1001-1008.
27. Wu J.Y., Denner L.A., Wei S.C., Lin C.T., Song G.W., Xu Y.F., Liu J.W. y Lin H.S. (1986) "Production and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies to rat brain L-glutamate decarboxylase" *Brain Res.* 373:1-14.
28. Chang Y.C. y Gottlieb D.I. (1988) "Characterization of the proteins purified with monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase" *J. Neurosci.* 8:2123-2130.
29. Escalapez M. Tillakaratne N.J., Kaufman D.L., Tobin A.J. y Houser C.R. (1994) "Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms" *J. Neurosci.* 14(3):1834-1855.
30. Jackson F.R., Newby L.M. y Kulkarni S.J. (1990) "Drosophila GABAergic systems: sequence and expression of glutamic acid decarboxylase" *J. Neurochem.* 54:1068-1078.
31. Kelly C.D., Edwards Y., Johnstone A.P., Harfst E., Nógrádi A., Nussey S.S., Povey S. y Carter N.D. (1992) "Nucleotide sequence and chromosomal assignment of a cDNA encoding the large isoform of human glutamate decarboxylase" *Ann. Hum. Genet.* 56:255-265.
32. Karlsen A.E., Hagopian W.A., Grubin C.E., Dube S., Distèche C.M., Adler D.A., Barmeier H., Mathewes S., Grant F.J., Foster D. y Lernmark A. (1991) "Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8337-8341.

33. Rimvall K. y Martin D.L. (1994) "The level of GAD<sub>67</sub> protein is highly sensitive to small increases in intraneuronal  $\gamma$ -aminobutyric acid levels" *J. Neurochem.* 62:1375-1381.
34. Weiland N.G. (1992) "Glutamic acid decarboxylase messenger ribonucleic acid is regulated by estradiol and progesterone in the hippocampus" *Endocrinology* 131:2697-2702.
35. Edwards R.H. (1992) "The transport of neurotransmitters into synaptic vesicles" *Curr. Op. Neurobiol.* 2:586-594.
36. Hell J.W., Maycox P.R., Jahn R. (1990) "Energy dependence and functional reconstitution of the  $\gamma$ -aminobutyric acid carrier from synaptic vesicles" *J. Biol. Chem.* 265:2111-2117.
37. Burger P.M., Hell J.W., Mehl E., Krasel C., Lotispeich F. y Jahn R. (1991) "GABA and glycine in synaptic vesicles: storage and transport characteristics" *Neuron* 7:287-293.
38. Sitges M., Chiu L.M. y González L. (1993) "Vesicular and carrier-mediated depolarization-induced release of [<sup>3</sup>H]GABA: inhibition by amiloride and verapamil" *Neurochem. Res.* 18(10):1081-1087.
39. Bormann J. (1988) "Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> receptor subtypes" *TINS* 11(3):112-116.
40. Burt D.R. y Kamatchi G.L. (1991) "GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology" *FASEB J.* 5:2916-2923.
41. Staley K.J., Soldo B.L. y Proctor W.R. (1995) "Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA<sub>A</sub> receptors" *Science* 269:977-981.
42. Steinhauser C., Jabs R. y Kettenmann H. (1994) "Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice" *Hippocampus* 4(1):19-36.
43. Hahner L., McQuilkin S. y Harris R.A. (1991) "Cerebellar GABA<sub>B</sub> receptors modulate function of GABA<sub>A</sub> receptors" *FASEB J.* 5:2466-2472.
44. Matthews G., Ayoub G.S. y Heidelberger R. (1994) "Presynaptic inhibition by GABA is mediated by two distinct GABA receptor with novel pharmacology" *J. Neuroscience* 14(3):1079-1090.

45. Amara S.G. y Arriza J.L. (1993) "Neurotransmitter transporters three distinct gene families" *Curr. Op. Neurobiol.* 3:337-344.
46. Rattray M. y Priestley J.V. (1993) "Differential expression of GABA transporter-1 messenger RNA in subpopulations of GABA neurons" *Neurosci. Lett.* 156:163-166.
47. Erecinska M. y Silver I.A. (1990) "Metabolism and role of glutamate in mammalian brain" *Prog. Neurobiol.* 35:245-296.
48. Medina-Kauwe L.K., Tillakaratne N.J.K., Wu J.Y. y Tobin A.J. (1994) "A rat brain cDNA encodes enzymatically active GABA transaminase and provides a molecular probe for GABA-catabolizing cells" *J. Neurochem.* 62:1267-1275.
49. Vincent S.L., Pabreza L. y Benes F.M. (1995) "Postnatal maturation of GABA-immunoreactive neurons of rat medial prefrontal cortex" *J. Comp. Neurol.* 355:81-92.
50. Luhmann H.J. y Prince D.A. (1991) "Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex" *J. Neurophysiol.* 65(2):247-263.
51. Gaiarsa J.L., McLean H., Congar P., Leinekugel X., Khazipov R., Tseeb V. y Ben-Ari Y. (1995) "Postnatal maturation of gamma-aminobutyric acid  $A^-$  and  $B^-$  mediated inhibition in the CA3 hippocampal region of the rat" *J. Neurobiol.* 26(3):339-349.
52. Christensen H. y Fonnum F. (1992) "The ontogeny of the uptake systems for glutamate, GABA and glycine in synaptic vesicles isolated from rat brain" *Neurochem. Res.* 17(5):457-462.
53. Greif K.F., Erlander M.G., Tillakaratne N.J.K. y Tobin A.J. (1991) "Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum" *Neurochem. Res.* 16(3):235-242.
54. Cherubini E., Gaiarsa J.L. y Ben-Ari Y. (1991) "GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life" *TINS* 14(12):515-519.
55. Fisher, R.S. (1989) "Animal models of the epilepsy" *Brain Res. Rev.* 14:245-278.
56. Loscher W. y Schmidt D. (1993) "New drugs for the treatment of epilepsy" *Curr. Op. Invest. Drugs* 2:1067-1095.
57. Taratara A., Manni R., Galimberti C.A., Mumford J.P., Iudice A. y Perucca E. (1989) "Vigabatrin in the treatment of epilepsy: a long-term follow-up study" *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 52:467-471.

58. Drugan R.C. y Holmes P.V. (1991) "Central and peripheral benzodiazepine receptors: involvement in organism's response to physical and psychological stress" *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15:277-298.
59. Paredes R.G. y Agmo A. (1992) "GABA and Behavior: the role of receptor subtypes" *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16:145-170.
60. Reiner A., Albin R.L., Anderson K.D., D'Amato C., Penney J.B. y Young A.B. (1988) "Differential loss of striatal projection neurons in Huntington's disease" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5733-5737.
61. Obenaus A., Escalapez M. y Houser C.R. (1993) "Loss of glutamate decarboxylase mRNA-containing neurons in the rat dentate gyrus following pilocarpine-induced seizures" *J. Neurosci.* 13(10): 4470-4485.
62. Romijn H.J., Ruijter J.M. y Wolters P.S. (1988) "Hypoxia preferentially destroys GABAergic neurons in developing rat neocortex explants in culture" *Exp. Neurol.* 100:332-340.
63. Brouillet E., Jenkins B.G., Hyman B.T., Ferrante R.J., Kowall N.W., Srivastava R., Roy D.S., Rosen B.R. y Beal M. (1993) "Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid" *J. Neurochem.* 60:356-359.
64. Choi D.W. (1988) "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system" *Neuron* 6:623-634.
65. Cotman C.W., Foster A. y Lanthorn T. (1981) "An overview of glutamate as a neurotransmitter" En: *Glutamate as a neurotransmitter* (Di Chiara, G. y Gessa, G.L., eds.) Raven Press, New York, p.p. 1-27.
66. Waelsh H. (1951) "Glutamic acid and cerebral function" *Advan. Protein Chem.* 6:299-341.
67. Robinson M.B. y Coyle J.T. (1987) "Glutamate and related acidic excitatory neurotransmitters: from basic science to clinical application" *FASEB J.* 1:446-455.
68. Watkins J.C. y Evans R.H. (1981) "Excitatory amino acid transmitters" *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21:165-204.
69. McGeer P.L. y McGeer E.G. (1989) "Amino acid neurotransmitters" En: *Basic Neurochemistry* (Siegel, G., Agranoff, B., Albers, R.W. y Molinoff, P., eds.), 4ta. ed., Raven Press, New York, p.p. 311-332.

70. Becquet D., Faudon M. y Henry F. (1990) "In vivo evidence for an inhibitory glutamatergic control of serotonin release in the cat caudate nucleus: involvement of GABA neurons" *Brain Res.* 519:82-88.
71. Magnusson K.R., Larson A.A., Madl J.E., Altschuler R.A. y Beitz A.J. (1986) "Colocalization of fixative-modified glutamate and glutaminase in neurons of the spinal trigeminal nucleus of the rat: an immunohistochemical and immunoradiochemical analysis" *J. Comp. Neurol.* 247:477-490.
72. Kauppinen R.A., McMahon H.T. y Nicholls D.G. (1988) "Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: possible relevance to hypoglycemia and anoxia" *Neuroscience* 27(1):175-182.
73. Nicholls D.G., Sihra T.S. y Sánchez-Prieto J. (1987) "Calcium dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry" *J. Neurochem.* 49:50-57.
74. Kanner B. y Marva E. (1982) "Efflux of L-glutamate by synaptic plasma membrane vesicles from rat brain" *Biochemistry* 21:3143-3147.
75. Logan W.J. y Snyder S.H. (1972) "High-affinity uptake systems for glycine, glutamate and aspartate in rat CNS synaptosomes" *Brain Res.* 42:413-431.
76. Stallcup W.B., Bulloch K. y Baetge E.E. (1979) "Coupled transport of glutamate and sodium in cerebellar nerve cell line" *J. Neurochem.* 32:57-65.
77. Takagaki G. y Konagaya H. (1985) "Properties of the uptake and release of neurotransmitter glutamate in cerebral cortical tissue of guinea pigs" *Neurochem. Res.* 10(8):1059-1069.
78. Trotti D., Danbolt N.C. y Volterra A. (1988) "Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration?" *TIPS* 19:328-334.
79. Buhle C.P. y Sonnhof V. (1983) "The mechanism of the excitatory amino acid receptors" *TINS* 10:265-272.
80. Slaeczek F., Pin J.P., Recansens M., Bockaert J. y Weiss S. (1985) "Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurons" *Neuron* 2:413-419.
81. Foster A.C. y Fagg G.E. (1984) "Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: Their characteristics and relationship to synaptic receptors" *Brain Res. Rev.* 7:103-164.

82. Watkins J.C. y Olverman H. (1987) "Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors" *TINS* 10:265-272.
83. Lipton S.A. y Rosenberg P.A. (1994) "Excitatory aminoacids a final common pathway for neurologic disorders" *New Eng. J. Med.* 330(9):613-622.
84. Nakanishi S. (1992) "Molecular diversity of glutamate receptors and implication for brain function" *Science* 258:597-603.
85. Barinaga M. (1995) "A new face for the glutamate receptor" *Science* 267:177-1778.
86. Mayer M.L. y Westbrook G.L. (1987) "The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system" *Prog. Neurobiol.* 28:197-276.
87. Cotman C.W. y D.T. Monaghan D.T. (1988) "Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptor and Hebb-type synaptic Plasticity" *Ann. Rev. Neurosci.* 11:61-80.
88. Huntley G.W., Vickers J.C. y Morrison J.H. (1994) "Cellular and synaptic localization of the NMDA and no-NMDA receptor subunits in neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease" *TINS* 17(12):536-543.
89. Mori H. y Mishina M. (1995) "Review: Neurotransmitter Receptors VIII. Structure and Function of the NMDA Receptor Channel" *Neuropharmacology* 34(10):1219-1237.
90. Monaghan T.D., Bridges J.R. y Cotman C.W. (1989) "The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system" *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:365-402
91. Bettler B. y Mulle C. (1995)"Review: Neurotransmitter Receptors II. AMPA and Kainate Receptors" *Neuropharmacology* 34(2):123-139.
92. Henley J.M. (1994) "Kainate-binding proteins: phylogeny, structures and possible functions" *TIPS* 15:182-190.
93. Schoepp D.D. y Conn P.J. (1993) "Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology" *TIPS* 14:13-20.
94. Pin J.P. y Duvoisin R. (1995) "Review: Neurotransmitter receptors I. The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure and Functions" *Neuropharmacology* 34(1):1-26.

95. Ferkany J.W., Zaczek R. y Coyle J.T. (1982) "Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors" *Nature (Lond.)* 298:757-759.
96. Wade J.V., Samson F.E., Nelson S.R. y Pazdernik T.L. (1987) "Changes in extracellular amino acids during soman- and kainic acid-induced seizures" *J. Neurochem.* 49:645-650.
97. Perreault P. y Avoli M. (1991) "Physiology and pharmacology of epileptiform activity by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices" *J. Neurophysiol.* 65(4):771-785.
98. Yamaguchi S. y Rogawski M.A. (1992) "Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice" *Epilepsy Res.* 11:9-16.
99. Morales-Villagrán A., Ureña-Guerrero M.E. y Tapia R. (1996) "Protection by NMDA receptor antagonist seizures induced by intracerebral administration of 4-aminopyridine" *Eur. J. Pharmacol.* 305:87-93.
100. Meldrum B. (1985) "Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters" *Clin. Sci.* 68:118-122.
101. Kaku D.A., Giffard R.G. y Choi D.W. (1993) "Neuroprotective effects of glutamate antagonists and extracellular acidity" *Science* 260:1516-1518.
102. Izumi Y., Clifford D.B. y Zorumski C.F. (1991) "2-Amino-3-phosphonopropionate blocks the induction and maintenance of long-term potentiation in rat hippocampal slices" *Neurosci. Lett.* 122:187-190.
103. Lucas D.R. y Newhouse J.P. (1957) "The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina" *Arch. Ophthalmol.* 58:193-204.
104. Olney J.W. (1969) "Brain lesions, obesity and disturbances in mice treated with monosodium glutamate" *Science* 164:719-721.
105. Olney J.W., Rhee V. y Ho O.L. (1974) "Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate" *Brain Res.* 77:507-512.
106. Olney J.W. y Sharpe L.G. (1969) "Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate" *Science* 166:386-388.
107. Olney J.W., Ho O.L. y Rhee V. (1971) "Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system" *Exp. Brain Res.* 14:61-76.



108. Choi, C.W. y Rothman S.M. (1990) "The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death" *Annu. Rev. Neurosci.* 13:171-182.
109. Meldrum B. (1993a) "Amino acids as dietary excitotoxins: a contribution to understanding neurodegenerative disorders" *Brain Res. Rev.* 18:293-314.
110. Meldrum B. (1993b) "Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy" *Brain Pathol.* 3:405-412.
111. Beal M.F., Ferrante R.J., Swartz K.J. y Kowall N.W. (1991) "Chronic quinolenic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease" *J. Neurosci.* 13:4181-4192.
112. Romano C., Price M.T. y Olney J.W. (1995) "Delayed excitotoxic neurodegeneration induced by excitatory amino acid agonists in isolated retina" *J. Neurochem.* 65:59-67.
113. Greene J.G. y Greenamyre J.T. (1996) "Bioenergetics and glutamate excitotoxicity" *Prog. Neurobiol.* 48:61-634.
114. Almeida A., Heales S.J.R., Bolaños J.P. y Medina J.M. (1998) "Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion" *Brain Res.* 790:209-216
115. Montal M. (1998) "Mitochondria, glutamate neurotoxicity and death cascade" *Biochim. Biophys. Acta* 1366:113-126.
116. Massieu L. y García O. (1998) "The role of excitotoxicity and metabolic failure in the pathogenesis of neurological disorders" *Neurobiology* 6(1):99-108.
117. Portéra-Cailliau C., Price D.L. y Martin L.J. (1997) "Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum" *J. Com. Neurol.* 378:70-87.
118. Portéra-Cailliau C., Price D.L. y Martin L.J. (1997) "Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: Further evidence for an apoptosis-necrosis continuum" *J. Com. Neurol.* 378:88-104.
119. Bonfoco E., Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P. y Lipton S.A. (1995) "Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7152-7166.

120. Beal M.F., Brouillet E., Jenkins B., Henshaw R., Rosen B. y Hyman B.T. (1993) "Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate" *J. Neurochem.* 61:1147-1150.
121. Wullner U., Young A.B., Penney J.B. y Beal M.F. (1994) "3-Nitropropionic acid toxicity in the striatum" *J. Neurochem.* 63:1772-1781.
122. Garattini S. (1979) "Evaluation of the neurotoxic effects of glutamic acid" En: *Nutrition and the Brain Vol. 4* (Wurtman R.J. y Wurtman J.J., eds.) Raven Press, New York, p.p.79-116.
123. Beas-Zárate C., Sánchez-Ruíz M.Y., Ureña-Guerrero M.E. y Feria-Velasco, A. (1998) "Effect of perinatal administration of monosodium L-glutamate to young rats on GABA release from various cerebral regions during postnatal development" *Neurochem. Int.* 33:217-232.
124. Ortuño-Sahagún D., Beas-Zárate C., Adame-González G. y Feria-Velasco A. (1997) "Effect of glutamate on cholinergic neurotransmission in various brain regions and during the development of rats, when administered perinatally" *Neurochem. Int.* 31:683-692.
125. Beas-Zárate C., Ureña-Guerrero M.E., Feria-Velasco A. y López-Colomé A.M. (1999) "Binding of [<sup>3</sup>H]-Glu in different areas of the rat brain after neonatal treatment with monosodium glutamate" *Dev. Neurosci.* (enviado a publicación)
126. Flores-Mendoza C. (1997) "Determinación de receptores a glutámico tipo kainato en ratas tratadas con glutamato monosódico en edad temprana" (Tesis de Licenciatura, Químico-Farmacobiólogo), U. de G., Guadalajara, Jalisco, México
127. Tapia R. y Salazar P. (1991) "Glutamate decarboxylase activity in the sustantia nigra and the hippocampus of rats microinjected with inhibitors of the enzyme" *Neurochem. Res.* 16(3):263-267.
128. Lowry O.H., Rosenburgh N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) "Protein measurement with the folin phenol reagent" *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
129. Feria-Velasco A. y Karnovsky M.J. (1970) "Preservación óptima del sistema nervioso central por perfusión con glutaraldehído para estudio ultraestructural" *Arch. Inv. Méd.* 1:201-20.
130. Kummer W., Hauser-Kronber C. y Muss W. (1994) "Pre-embedding immunochemistry in transmission electron microscopy" En: *Modern Methods in Analytical Morphology* (Gu J. y Hacker W., eds.), Plenum Press, N.Y., U.S.A., 416 págs.

131. Orozco-Suárez S. (1996) "Efecto de la restricción de triptófano en la dieta sobre el desarrollo de la inervación GABAérgica en la corteza somatosensorial de la rata. Estudio Inmunocitoquímico" (Tesis Maestría en Ciencias Biomédicas, Orientación Morfología), U.N.A.M., México, D.F.
132. Paxinos G. y Watson C. (1986) "The rat brain in stereotaxic coordinates", 2da. ed., *Academic Press*, New York.
133. Kiser P.J., Cooper N.G.F. y Mower G.D. (1998) "Expression of two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD67 and GAD65) during postnatal development of rat somatosensory barrel cortex" *J. Comp. Neurol.* 402:62-74.
134. Mitchell I.J., Lawson S., Moser B., Laidlaw S.M., Cooper A.J., Walkinshaw G. y Waters C.M. (1994) "Glutamate-induced apoptosis results in a loss of striatal neurons in the parkinsonian rat" *Neuroscience* 63(1):1-5.
135. Seress L. y Ribak C.E. (1988) "The development of GABAergic neurons in the rat hippocampal formation. An immunocytochemical study" *Dev. Brain Res.* 44:197-209.
136. Spreafico R. y Frassoni C. (1993) "Morphological aspects of neocortical maturation" En: *Epileptogenic and Excitotoxic Mechanisms* (Avanzini G., Fariello R., Heinemann U. y Mutani R., eds.), John Libbey & Company Ltd., pp.59-66.
137. Coyle J.T. (1982) "Development of neurotransmitters in the neocortex" *Neurosci. Res. Bull.* 20:479-491.
138. Morin F., Beaulieu C. y Lacaille J.C. (1998) "Selective loss of GABA in area CA1 of the rat hippocampus after intraventricular kainate" *Epilepsy Res.* 32:363-369.
139. Segovia J., Tillakaratne N.J.K., Whelan K., Tobin A.J. y Gale K. (1990) "Parallel increases in striatal glutamic acid decarboxylase activity and mRNA levels in rats with lesions of nigrostriatal pathway" *Brain Res.* 493:185-189.
140. Soghomonian J.J. y Chesselet M.F. (1992) "Effects of nigrostriatal lesions on the levels of messenger RNAs encoding two isoforms of glutamate decarboxylase in the globus pallidus and entopeduncular nucleus of the rat" *Synapse* 11:124-133.
141. Marksteiner J. y Sperk (1988) "Concomitant increase of somatostatin, neuropeptide Y and glutamate decarboxylase in the frontal cortex of rats with decreased seizure threshold" *Neuroscience* 26:379-385.
142. Leifer D. y Kowall N.W. (1993) "Immunohistochemical patterns of selective cellular vulnerability in human cerebral ischemia" *J. Neurol. Sci.* 119:217-228.

143. Gonzales C. Lin R.C.S. y Chesselet M.F. (1992) "Relative sparing of GABAergic interneurons in the striatum of gerbils with ischemia-induced lesions" *Neurosci. Lett.* 135:53-58.
144. Davenport C.J., Brown W.J. y Babb T.L. (1990) "Sprouting of GABAergic and mossy fiber axons in dentate gyrus following intrahippocampal kainate in the rat" *Expl. Neurol.* 109:180-190.
145. Schwarzer C., Tsunashima K., Wanzenböck C., Fuchs K., Sieghart W. y Sperk G. (1997) "GABA<sub>A</sub> receptor subunits in the rat hippocampus II: altered distribution in kainic acid-induced temporal lobe epilepsy" *Neuroscience* 80(4):1001-1017.
146. Cherubini E. (1993) "GABA excites immature rat CA3 hippocampal neurons" En: *Epileptogenic and Excitotoxic Mechanisms* (Avanzini G., Fariello R., Heinemann U. y Mutani R., eds.), John Libbey & Company Ltd., pp.115-119.
147. Franceschetti S., Buzio S., Panzica F., Sancini G. y Avanzani G. (1993) "Postnatal development of EAA-mediated excitation in rat neocortex" En: *Epileptogenic and Excitotoxic Mechanisms* (Avanzini G., Fariello R., Heinemann U. y Mutani R., eds.), John Libbey & Company Ltd., pp. 107-114.
148. Insel T.R., Miller L.P. y Gelhard R.E. (1990) "The ontogeny of excitatory receptors in rat forebrain. I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors" *Neuroscience* 35:45-52.
149. Mattson M.P. (1988) "Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture" *Brain Res. Rev.* 13:179-212.
150. Komuro H. y Rakic P. (1993) "Modulation of neuronal migration by NMDA receptors" *Science* 260:95-97.
151. Bahn S., Volk B. y Wisden W. (1994) "Kainate receptor gene expression in the developing rat brain" *J. Neurosci.* 14:5525-5547.
152. Leinekugel X., Medina I., Khalilov I., Ben-Ari Y. y Khazipov R. (1997) "Ca<sup>2+</sup> oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA<sub>A</sub> and NMDA receptors in the neonatal hippocampus"
153. Barker J.L., Behar T., Li Y.X., Liu Q.Y., Ma W., Maric D., Maric I., Schaffner A.E., Serafini R. Smith S.V., Somogyi R., Vautrin J.Y. Wen X.L. y Xian H. (1998) "GABAergic cells and signal in CNS development" *Perspective Dev. Neurobiol.* 5(2-3):305-322.

154. Dawson R. Jr., Valdes J.J. y Annau Z. (1982) "High-affinity uptake of hypothalamic neurotransmitters in mice treated neonatally with monosodium glutamate" *Neuroendocrinology* 34(4):292-296.
155. Steinhäuser C. y Gallo V. (1996) "News on glutamate receptor in glial cells" *TINS* 19(8):336-345.
156. Hu L., Fernstrom J.D. y Goldsmith P.C. (1998) "Exogenous glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice" *Neuroendocrinology* 68(2):77-88.
157. Beas-Zárate C., Rivera-Huizar S.V., Sánchez-Ruiz M.Y., Feria-Velasco A. y Armendariz-Borunda J. (1998) "NMDA-receptor gene expression is differentially modulated by glutamate in rat brain regions", *Neuropharmacology* (enviado a publicación).
158. Burg M.B., Kwon E.G. y Kültz D. (1996) "Osmotic regulation of gene expression", *FASEB J.* 10:1598-1606.