

177
2 ej
0



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ACCION CONVULSIVANTE DE LA L-T-GLU- TAMIL HIDRAZONA DEL FOSFATO DE PIRIDOXAL Y SU RELACION CON EL SISTEMA GABAERGICO CEREBRAL DE RATAS EN DESARROLLO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
AMBROSIO RIVERA PAZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

	PÁG.
I. INTRODUCCIÓN	1
A. GENERALIDADES.	
1. MORFOLOGÍA NEURONAL Y COMUNICACIÓN NERVIOSA.....	2
2. ACIDO T-AMINOBUTIRICO (GABA).....	10
A) IMPORTANCIA DEL GABA COMO NEUROTRANSMISOR INHIBIDOR.....	10
B) BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DEL GABA.....	11
C) ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA TRANSMISIÓN GABAÉRGICA.....	15
I) GAD.....	15
II) GABA-T.....	18
III) SSADH.....	19
D) VITAMINA B ₆ Y EL FOSFATO DE PIRIDOXAL (PLP) 20	
3. EL GABA Y SU RELACIÓN CON LAS CONVULSIONES.....	23
II. ANTECEDENTES INMEDIATOS DEL ESTUDIO.....	26
A. LA T-GLUTAMIL HIDRAZONA DEL FOSFATO DE PIRIDOXAL (PLPGH).	26
III. OBJETIVO.....	28
IV. MATERIALES Y MÉTODO.....	29
A. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.....	29
1) MÉTODO RADIOQUÍMICO.....	30
2) MÉTODO ENZIMÁTICO.....	31

V. RESULTADOS.....	34
A. CARACTERÍSTICAS DE LA CONDUCTA PRESENTADA POR LAS RATAS EN LAS DIFERENTES EDADES.....	34
B. ACTIVIDAD DE LA GAD	36
1) MÉTODO RADIOQUÍMICO	36
2) MÉTODO ENZIMÁTICO	37
3) NIVELES ENDÓGENOS DE GABA	40
4) INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD	43
5) PORCENTAJE DE ACTIVACIÓN DE LA GAD	45
VI. DISCUSIÓN	47
VII. CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	55

I. INTRODUCCION

EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL ES EL MAS COMPLEJO DEL ORGANISMO. SIN EMBARGO, LAS CELULAS NERVIOSAS INDIVIDUALES ESTAN MEJOR COMPRENDIDAS QUE LA MAYORIA DE OTROS TIPOS CELULARES. A PARTIR DE PROPIEDADES PARTICULARES SE PUEDE EXPLICAR EL FUNCIONAMIENTO DE PEQUEÑAS PARTES DE ESTE SISTEMA.

LA IMPORTANCIA DE ESTUDIAR EL SISTEMA NERVIOSO RADICA EN LAS FUNCIONES DEL MISMO YA QUE REGULA EL COMPORTAMIENTO, DE ACUERDO A LAS CIRCUNSTANCIAS EXTERNAS, Y COORDINA LAS ACTIVIDADES INTERNAS DEL CUERPO. PARA QUE ESTAS FUNCIONES SE LLEVEN A CABO DEBE HABER UNA INFORMACIÓN SENSORIAL, LA CUAL PENETRA EN EL SISTEMA, Y ÉSTE PRODUCE UNA RESPUESTA EN FORMA DE SEÑALES QUE CONTROLAN LAS CONTRACCIONES MUSCULARES, LAS SECRECIONES GLANDULARES, ETC.

CUALQUIER ESTIMULO QUE PENETRA EN EL SISTEMA NERVIOSO ES TRANSFORMADO A UNA SEÑAL ELÉCTRICA. EL SIGNIFICADO DEL MENSAJE ELÉCTRICO ESTÁ DADO POR EL DISPOSITIVO QUE EFECTÚA LA CONVERSIÓN (TRANSDUCTOR). CADA TRANSDUCTOR RESPONDE A UN ASPECTO ESPECÍFICO DEL AMBIENTE O A UN TIPO PARTICULAR DE ESTIMULO, TALES COMO LA LUZ, LA TEMPERATURA, UN COMPUESTO QUÍMICO ESPECÍFICO, O UNA FUERZA O DESPLAZAMIENTO MECÁNICO.

LOS TRANSDUCTORES SUMINISTRAN AL SISTEMA NERVIOSO UN AMPLIO FLUJO DE INFORMACIÓN SENSORIAL Y EL CEREBRO DEBE PROCESAR ESTA INFORMACIÓN. LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA TRANSDUCCIÓN, COMO DEL PROCESAMIENTO POSTERIOR DE LOS DATOS SENSORIALES POR PARTE DEL CEREBRO, SON POCO CONOCIDOS.

A. GENERALIDADES.

1. MORFOLOGIA NEURONAL Y COMUNICACION NERVIOSA.

LA FUNCIÓN ESPECÍFICA DE LAS NEURONAS, CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO ES LA DE GENERAR Y TRANSMITIR SEÑALES ELÉCTRICAS A TRAVÉS DE LAS CUALES SE DISTRIBUYE Y PROCESA LA INFORMACIÓN EXTRAÍDA DEL MEDIO AMBIENTE. ÉSTA FUNCIÓN SE LOGRA GRACIAS A LA PRESENCIA DE UNA MEMBRANA SELECTIVAMENTE PERMEABLE A LOS DISTINTOS IONES PRESENTES EN LOS MEDIOS INTRA Y EXTRACELULAR. LOS CAMBIOS EN LA PERMEABILIDAD IÓNICA SON LOS RESPONSABLES DE LA GENERACIÓN Y PROPAGACIÓN DE LOS IMPULSOS.

LAS NEURONAS TIENEN DIVERSAS FORMAS, PERO EN GENERAL SE DIVIDEN EN TRES PORCIONES (FIG. 1):

SOMA O CUERPO CELULAR.- CONSTITUIDO POR EL CITOPLASMA, EL NÚCLEO Y LOS ORGANELOS CELULARES.

DENDRITAS.- SON PROLONGACIONES QUE PARTEN DEL SOMA CELULAR, SE RAMIFICAN CERCA DE ÉSTE Y PROVEEN UNA GRAN SUPERFICIE DE CONTACTO EN DONDE SE RECIBEN LA MAYORÍA DE LAS SEÑALES PROVENIENTES DE LAS DEMÁS CÉLULAS.

AXÓN. ES UNA PROLONGACIÓN DEL SOMA DE LONGITUD VARIABLE, ES LA VÍA DE TRANSMISIÓN AFERENTE DE LAS SEÑALES RECIBIDAS POR LAS DENDRITAS Y PROCESADAS POR EL SOMA HASTA SU EXTREMO TERMINAL EN DONDE HACE CONTACTO CON UNA SEGUNDA O MÁS NEURONAS. EN SU PORCIÓN TERMINAL, EL AXÓN SE ENSANCHA FORMANDO BOTONES SINÁPTICOS QUE CONTIENEN MITOCONDRIAS, MICROTÚBULOS, NEUROFILAMENTOS Y VESÍCULAS SINÁPTICAS, LAS CUALES JUEGAN UN PAPEL IMPORTANTE EN LA COMUNICACIÓN NEURONAL.

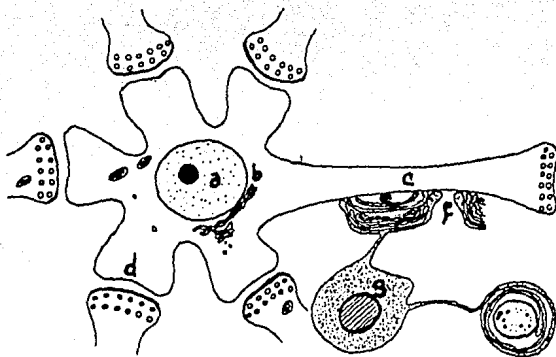


FIG. 1. ESTRUCTURA FUNCIONAL DE LA NEURONA. A) NÚCLEO, B) SOMA, C) AXÓN, D) DENDRITAS, E) MIELINA, F) NODO DE RANVIER, G) OLIGODENDROCITO, (MODIFICADO⁴⁴).

EL BOTÓN SINÁPTICO FORMA PARTE DE LA ENTIDAD LLAMADA SINAPSIS, TÉRMINO INTRODUCIDO POR SHERRINGTON EN 1897¹ PARA DENOMINAR LA REGIÓN DE COMUNICACIÓN EN QUE UNA NEURONA, SEPARADA POR UN ESPACIO INTERSINÁPTICO SE COMUNICA CON OTRA.

EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL, LOS AXONES SE ENCUENTRAN RODEADOS DE UNA VAINA DE MIELINA DERIVADA DE LAS CÉLULAS GLIALES, CONOCIDAS COMO OLIGODENDROCITOS, MIENTRAS QUE EN EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO, SON LAS CÉLULAS DE SCHWAN LAS QUE PROVEEN DEL RECUBRIMIENTO MIELÍNICO DE LOS AXONES, EL CUAL SE ENCUENTRA INTERRUMPIDO PERIÓDICAMENTE POR ESPACIOS REGULARES CONOCIDOS COMO NÓDULOS DE RANVIER.

LA CONDUCCIÓN DE LOS IMPULSOS ES MÁS RÁPIDA EN LOS AXONES MIELINIZADOS, Y ES DE CARACTER SALTATORIO PUESTO QUE LA VAINA FUNCIONA COMO UN AISLANTE Y LOS CAMBIOS DE VOLTAJE SE PROPAGAN DE NODO A NODO.

LAS CÉLULAS NEURONALES DE MANERA GENERAL SE COMUNICAN, POR MEDIO DE SINAPSIS ELÉCTRICAS Y QUÍMICAS.

SINAPSIS ELÉCTRICA.- EN LA (FIG.2) ESTA REPRESENTADA LA SINAPSIS ELÉCTRICA Y SE CARACTERIZA POR LA PRESENCIA DE UN ESPACIO INTERSINÁPTICO (ESPACIO DE FLUIDO EXTRACELULAR ENTRE LAS MEMBRANAS PRESINÁPTICA Y LA POSTSINÁPTICA) MUY REDUCIDO, TÍPICAMENTE DE 2 NM. EN ESTE TIPO SINAPSIS LAS NEURONAS SE COMUNICAN POR MEDIO DE UNA CORRIENTE IÓNICA, DE AHÍ QUE SE LE LLAME SINAPSIS ELÉCTRICA. A ESTE TIPO DE SINAPSIS TAMBIEN SE LE DENOMINA "UNIÓN COMUNICANTE" (GAP JUNCTION) Y SE ASOCIA CON UNA BAJA RESISTENCIA MEMBRANAL ENTRE LAS CÉLULAS, QUE PERMITE LA FÁCIL TRANSMISIÓN DE LA CORRIENTE ELÉCTRICA DE LA MEMBRANA PRESINÁPTICA A LA MEMBRANA POSTSINÁPTICA. LAS SINAPSIS ELÉCTRICAS SON BIDIRECCIONALES, NO SON EXCLUSIVAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PARECEN ESTAR INVOLUCRADAS EN FENÓMENOS DE TRANSMISIÓN RÁPIDA.

SINAPSIS QUÍMICA.- LAS SINAPSIS QUÍMICAS SE CARACTERIZAN POR PRESENTAR UN ESPACIO SINÁPTICO DE 20 NM, LLEVÁNDOSE A CABO EN 0.5 MSEG EN PROMEDIO, ENTRE LA DESPOLARIZACIÓN PRESINÁPTICA, LA LIBERACIÓN DE LOS NEUROTRANSMISORES, LA DIFUSIÓN DE ÉSTOS A TRAVÉS DEL ESPACIO SINÁPTICO Y LA INTERACCIÓN DEL TRANSMISOR CON EL RECEPTOR EN LA MEMBRANA POSTSINÁPTICA.

SE PUEDE DEFINIR A UN TRANSMISOR QUÍMICO COMO UNA SUBSTANCIA QUE ES LIBERADA SINÁPTICAMENTE POR UNA NEURONA, QUE AFECTA A OTRA

CÉLULA (NEURONA U ÓRGANO EFECTOR) DE UNA MANERA ESPECÍFICA. Estrictamente hablando, una sustancia que se considere como neurotransmisor debe cumplir con los siguientes criterios:

- 1.- Que en la neurona presináptica, se encuentren las enzimas determinantes de la síntesis del posible transmisor.
- 2.- Que esté presente en la terminal presináptica y sea liberado en cantidades suficientes para ejercer su acción en la neurona postsináptica u órgano efector.
- 3.- Que cuando se aplique exógenamente (como droga) en concentraciones razonables, la sustancia reproduzca exactamente la misma acción fisiológica del neurotransmisor liberado endógenamente.
- 4.- Que exista un mecanismo para eliminar al neurotransmisor de su sitio de acción.

Un neurotransmisor es capaz de inducir distintas respuestas en la célula receptora, como cambio en la probabilidad de disparo, que es una respuesta de tipo todo o nada, cambio del patrón intrínseco del disparo neuronal, o cambio en la respuesta temporal neuronal.

Este proceso puede explicarse de la siguiente manera:

Existe un potencial de reposo de la célula nerviosa, que es negativo en el interior (de -60 mV a -90 mV). La membrana neuronal es relativamente permeable a iones K^+ e impermeable al Na^+ y Ca^{2+} .

A la llegada de un estímulo umbral, la membrana genera un potencial de acción, durante el cual la permeabilidad al Na^+

AUMENTA, ORIGINÁNDOSE UNA DESPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA (+30 MV A 60 MV). SIN EMBARGO NI LA SALIDA DE K^+ , NI LA ENTRADA DE Na^+ , SON TAN IMPORTANTES PARA LA LIBERACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR, COMO LO ES LA APERTURA DE CANALES SENSIBLES A VOLTAJE DE LA MEMBRANA PRESINÁPTICA, POR LOS QUE ENTRA EL Ca^{2+} QUE ACTIVA EL MECANISMO ENCARGADO DE LA LIBERACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR¹⁰.

UNA VEZ LIBERADO EL NEUROTRANSMISOR ESTE DIFUNDE Y ALCANZA LA MEMBRANA POSTSINÁPTICA DONDE INTERACTÚA CON RECEPTORES ESPECÍFICOS QUE AHÍ SE ENCUENTRAN (FIG. 3). LA UNIÓN DEL NEUROTRANSMISOR AL RECEPTOR INDUCE UN CAMBIO CONFORMACIONAL DE ESTE ÚLTIMO, QUE DETERMINA QUE SE ABRAN CANALES DE Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , LO CUAL PERMITE A LOS IONES FLUIR A TRAVÉS DEL CANAL. LA INTERACCIÓN DEL NEUROTRANSMISOR CON SU RECEPTOR CONTINÚA MIENTRAS EL TRANSMISOR NO SEA INACTIVADO, QUE PUEDE OCURRIR POR DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA O POR SISTEMAS DE RECAPTURA, YA SEA POR LA TERMINAL SINÁPTICA, O POR LAS CÉLULAS GLIALES.

DEPENDIENDO DEL EFECTO QUE SOBRE LA NEURONA POSTSINÁPTICA EJERZA EL NEUROTRANSMISOR LIBERADO, LA ACTIVIDAD DE LA CÉLULA SECRETORA PUEDE SER EXCITADORA O INHIBIDORA¹¹. LOS NEUROTRANSMISORES MEJOR CONOCIDOS SE MUESTRAN EN EL CUADRO I.

LA COMUNICACIÓN QUÍMICA AUNQUE ES MÁS LENTA, ES MÁS FLEXIBLE YA QUE INTERCONECTA NEURONAS EXCITADORAS E INHIBITORIAS DE MANERA COMPLEJA, Y PERMITE UN GRADO MUCHO MAYOR DE REGULACIÓN.

EN EL PRESENTE TRABAJO NUESTRA ATENCIÓN SE CENTRA EN EL ÁCIDO T-AMINOBUTÍRICO, (GABA) EL CUAL ES UN NEUROTRANSMISOR INHIBIDOR QUE JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE EN EL CONTROL MOTOR, ADEMÁS DE PARTICIPAR EN MUCHAS OTRAS FUNCIONES CEREBRALES.

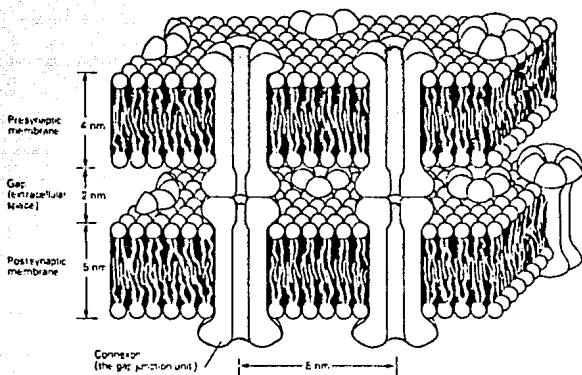


FIG. 2. SINAPSIS ELÉCTRICA. MODELO EN TERCERA DIMENSIÓN DE LA SINAPSIS QUÍMICA REVELADA POR DIFRACCIÓN DE RAYOS-X. (TOMADO DE ²).

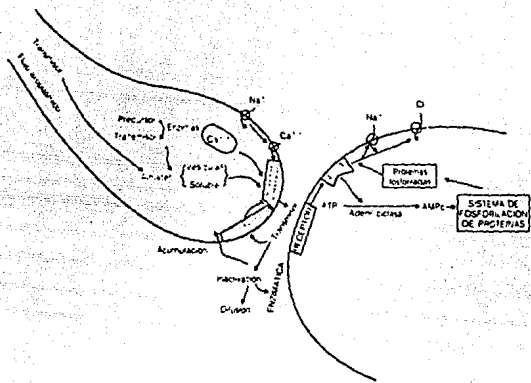
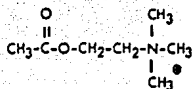


FIG. 3 ESQUEMA FUNCIONAL DE LA SINAPSIS QUÍMICA. EN LA PRESINAPSIS SE ENCUENTRAN LOS SISTEMAS DE ALMACENAMIENTO DEL TRANSMISOR, VESÍCULAS SINÁPTICAS Y CITOPLASMA, LOS MECANISMOS RESPONSABLES DE LA LIBERACIÓN DEL TRANSMISOR QUE SE ACTIVAN CUANDO LA CONCENTRACIÓN INTERNA DE IONES Ca^{2+} SE INCREMENTA, POR LA APERTURA DE LOS CANALES DE Ca^{2+} SENSIBLES AL VOLTAJE. DURANTE LA LLEGADA DE UN POTENCIAL DE ACCIÓN A LA TERMINAL SINÁPTICA O POR LA ACTIVIDAD DE LOS SISTEMAS QUE CONTROLAN LA CONCENTRACIÓN INTERNA DE Ca^{2+} , COMO LA MITOCONDRIAS, O EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO. EL TRANSMISOR LIBERADO INTERACCIONA CON SU RECEPTOR POSTSINÁPTICO ESPECÍFICO, QUE DEPENDIENDO DE LA NATURALEZA DEL TRANSMISOR PUEDE ORIGINAR CAMBIOS RÁPIDOS EN LA PERMEABILIDAD IÓNICA DE LA MEMBRANA POSTSINÁPTICA A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE CANALES ESPECÍFICOS PARA IONES Na^+ , Cl^- O K^+ . (TOMADO DE⁹).

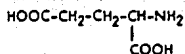
CUADRO. I. ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS NEUROTRANSMISORES DE BAJO PESO MOLECULAR MAS CONOCIDOS.

Excitadores

Acetilcolina

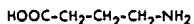


Acido glutámico

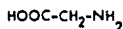


Inhibidores

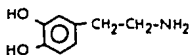
Acido γ -aminobutírico (GABA)



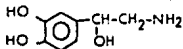
Glicina



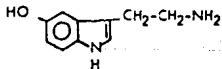
Dopamina*



Norepinefrina*



Serotonina*



- * LAS CATECOLAMINAS (DOPAMINA Y NOREPINEFRINA), ASÍ COMO LA SEROTONINA, TIENEN EFECTOS EXCITADORES SOBRE ALGUNAS NEURONAS. (TOMADO DE²⁰).

2. ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA).

A) IMPORTANCIA DEL GABA COMO NEUROTRANSMISOR INHIBIDOR.

EUGENE ROBERTS* Y JORGE AWAPARA⁷ DESCUBRIERON INDEPENDIEMENTE LA PRESENCIA DEL GABA EN EL TEJIDO CEREBRAL EN 1950. EL PAPEL DEL GABA COMO NEUROTRANSMISOR FUE SUGERIDO INICIALMENTE POR FLOREY Y COL.⁸ QUIENES LO ENSAYARON EN UNA NEURONA SENSORIAL DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO DE UN CRUSTÁCEO.

FLOREY Y COL.⁸ DEMOSTRARON QUE LA DESCARGA NEURONAL PODÍA SER INHIBIDA POR EL GABA, POR LOS EXTRACTOS DE CEREBROS DE MAMÍFEROS QUE CONTENÍAN GABA Y POR LOS EXTRACTOS DE LOS NERVIOS PERIFÉRICOS DEL CRUSTÁCEO. BAZEMORE⁹, MOSTRÓ QUE ESTE AMINOÁCIDO DUPLICABA LA ACCIÓN TRANSMISORA EN CIERTAS VÍAS SINÁPTICAS.

OBATA Y TAKEDA¹⁰ FUERON LOS PRIMEROS EN DEMOSTRAR LA LIBERACIÓN DE GABA EN SISTEMAS DE MAMÍFEROS, CUANDO OBSERVARON SU PRESENCIA EN EL CUARTO VENTRÍCULO, DESPUÉS DE QUE LAS CÉLULAS DE PURKINJE FUERON ESTIMULADAS.

LA CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DE ESTE NEUROTRANSMISOR ES PRECISAMENTE SU ACCIÓN INHIBIDORA. CON ESTUDIOS IONTOFORÉTICOS SE HA DEMOSTRADO QUE EL GABA INHIBE LA DESCARGA DE LAS NEURONAS DEL SNC DE LOS MAMÍFEROS.

LA PRIMERA EVIDENCIA DIRECTA QUE SE TUVO ACERCA DE QUE EL GABA ACTÚA COMO UNA SUSTANCIA TRANSMISORA INHIBIDORA EN EL SNC DE LOS MAMÍFEROS FUE HECHA EN 1967, CUANDO KRNEVIC Y SCHWARTS¹¹ COMPARARON LAS PROPIEDADES DE LOS POTENCIALES POSTSINÁPTICOS INHIBITORIOS (IPSPs) Y LA HIPERPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA INDUCIDA POR EL GABA. AMBAS ACCIONES SON DEPENDIENTES DE Cl^- CON

POTENCIALES DE INVERSIÓN SIMILARES, INDICANDO QUE EL GABA PODRÍA SER PRINCIPALMENTE UN TRANSMISOR INHIBIDOR.

EL AUMENTO EN LA CONDUCTANCIA AL Cl^- FUE BLOQUEADO SELECTIVAMENTE Y DE MANERA REVERSIBLE POR LA PRESENCIA DE BICUCULINA, UN ALCALOIDE VEGETAL, EL CUAL RESULTÓ SER UNA HERRAMIENTA IMPORTANTE EN EL ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN GABAÉRGICA. SIN EMBARGO EN ESTUDIOS POSTERIORES, LA BICUCULINA FUE INEFECTIVA BLOQUEANDO LOS EFECTOS DEL GABA, INDICANDO LA EXISTENCIA DE DOS TIPOS DIFERENTES DE RECEPTORES A GABA.

ACTUALMENTE SE CONOCE QUE LOS PROCESOS INHIBITORIOS MEDIADOS POR EL GABA SE LLEVAN A CABO ATRAVÉS DE DOS TIPOS DE RECEPTORES: $GABA_A$ Y $GABA_B$.

EL RECEPTOR $GABA_A$ ESTÁ INTEGRADO AL CANAL DE Cl^- Y HA SIDO OBJETO DE INTENSOS ESTUDIOS, SE ENCUENTRA MUY BIÉN CARACTERIZADO¹⁴. HAY MENOS INFORMACIÓN DISPONIBLE DEL RECEPTOR $GABA_B$, EL CUAL SE ACOPLA A CANALES DE Ca^{2+} O CANALES DE K^+ , INVOLUCRA LA ACTIVACIÓN DE PROTEINAS G EN LA MEMBRANA CELULAR Y PROBABLEMENTE OTROS MECANISMOS INTRACELULARES¹⁵.

B) BIOSINTESIS Y DEGRADACION DEL GABA.

LA GLUCOSA, LA PRINCIPAL FUENTE DE ENERGÍA DEL CEREBRO, ES UN PRECURSOR EFICIENTE DE GABA Y ES PROBABLEMENTE LA PRINCIPAL FUENTE "IN VIVO", A TRAVÉS DE LA FORMACIÓN DEL PIRUVATO, EL CUAL ENTRA AL CICLO DE KREBS HASTA LLEGAR A α -CETOGLUTARATO. ÉSTE POR UNA TRANSAMINACIÓN SE CONVIERTE EN GLUTAMATO QUE A SU VEZ ES EL PRECURSOR DIRECTO DEL GABA. EN LA (FIG. 4) MUESTRA LA VÍA METABÓLICA DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DEL GABA.

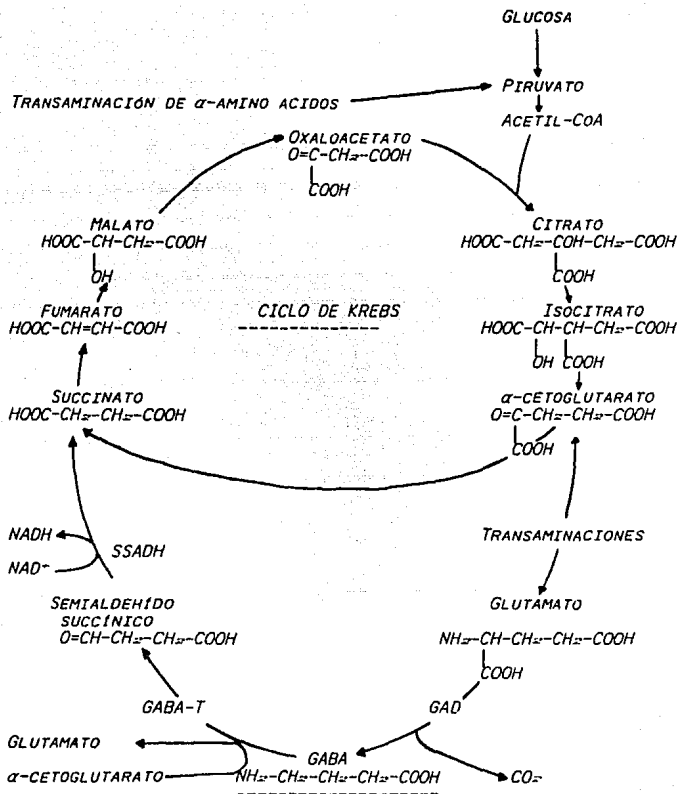


FIG. 4. VIA DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DEL GABA (MODIFICADO DE**). GABA-T, SSADH Y GAD VER PAGINAS 15-19.

LA VÍA METABÓLICA SE INICIA MEDIANTE LA TRANSAMINACIÓN DEL α -CETOGLUTARATO (FIG. 4) UN INTERMEDIARIO EN EL CICLO DE KREBS, A ACIDO GLUTÁMICO. EL ACIDO GLUTÁMICO ES DESCARBOXILADO POR LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA (GAD), PARA FORMAR GABA. EL GABA ES TRANSAMINADO POR LA GABA- α -OXO-GLUTARATO TRANSAMINASA (GABA-T) PARA FORMAR SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO. LA TRANSAMINACIÓN PUEDE LLEVARSE A CABO SÓLO SI EL SITIO DEL α -CETOGLUTARATO ES EL ACEPTOR DEL GRUPO AMINO. ESTA TRANSFORMACIÓN DE α -CETOGLUTARATO EN EL PRECURSOR DEL GABA, GLUTAMATO, PERMITE LA CONTINUA FORMACIÓN DE GABA.

EL SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO FORMADO DE GABA ES RÁPIDAMENTE OXIDADO A ACIDO SUCCÍNICO POR LA SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO DESHIDROGENASA (SSADH) PARA QUE EL SUCCÍNICO ENTRE NUEVAMENTE AL CICLO DE KREBS.

EL GABA DESPUÉS DE EJERCER SU ACCIÓN EN EL RECEPTOR POSTSINÁPTICO, SE ELIMINA DE LA HENDIDURA SINÁPTICA POR RECAPTURA PRESINÁPTICA Y POR CAPTURA DE CÉLULAS GLIALES¹⁴ (FIG 5). DESPUÉS DE SU CAPTURA, EL GABA ES METABOLIZADO POR LA GABA-T, LA CUAL TRANSFIERE EL GRUPO AMINO DEL GABA AL α -CETOGLUTARATO, FORMANDO SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO Y GLUTAMATO. EN CÉLULAS GLIALES EL GLUTAMATO ES CONVERTIDO A GLUTAMINA POR MEDIO DE LA GLUTAMINA SINTETASA, ENZIMA LOCALIZADA PRINCIPALMENTE EN LA GLÍA¹⁵ Y LA GLUTAMINA ES TRANSFERIDA A LA TERMINAL PRESINÁPTICA^{16, 17}.

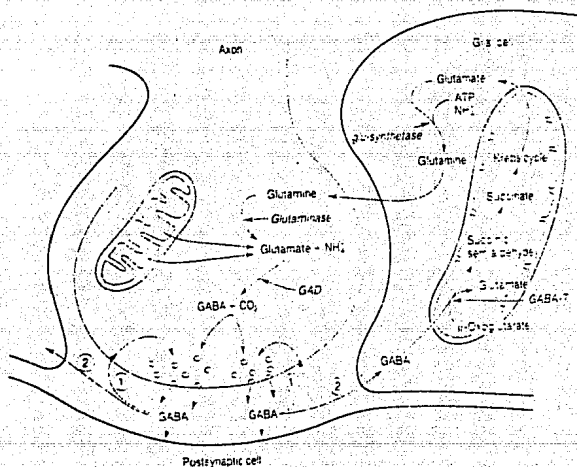


FIG. 5. DIAGRAMA DE UNA TERMINAL NERVIOSA GABAERGICA¹⁰.

C) ENZIMAS INVOLUCRADAS DIRECTAMENTE EN LA TRANSMISION
GABAÉRGICA.

EN LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA INTERVIENEN TRES ENZIMAS DE MANERA FUNDAMENTAL (FIG. 4.).

1) GLUTAMATO DESCARBOXILASA (GAD, EC 4.1.1.15), QUE CONVIERTE EL ÁCIDO GLUTÁMICO EN GABA, POR UNA REACCIÓN DE DESCARBOXILACIÓN.

LA ENZIMA RESPONSABLE EN LA SÍNTESIS DE GABA HA SIDO AISLADA DE CEREBRO DE RATÓN Y DE HUMANO¹⁹⁻²², USANDO UNA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD (SEPHADEX G-200) SE SEPARARON DOS FORMAS DE LA GAD EN EL RATÓN, UNA DE ALTO PESO MOLECULAR Y OTRA DE BAJO PESO MOLECULAR. LA PRESENCIA DE DOS FORMAS DE ACTIVIDAD DE LA GAD EN EXTRACTOS CRUDOS DE CEREBRO DE RATÓN HA SIDO TAMBIÉN INFERIDO DE EXPERIMENTOS CINÉTICOS^{23, 24}.

EN 1978 TAPIA Y COVARRUBIAS²⁵ Y COVARRUBIAS Y TAPIA²⁶, POSTULARON LA EXISTENCIA DE DOS POBLACIONES DE GAD EN LAS TERMINALES NERVIOSAS GABAÉRGIAS; UNA SOLUBLE EN EL SINAPTOPLASMA Y LA OTRA LOCALIZADA A NIVEL DE LA MEMBRANA PRESINÁPTICA, DIFERENCIÁNDOSE EN QUE LA PRIMERA DE ESTAS DOS ENZIMAS PROBABLEMENTE USA COMO SUSTRATO UN GLUTAMATO DERIVADO PREFERENTEMENTE DE GLUTAMINA, POR UNA REACCIÓN CATALIZADA POR LA GLUTAMINASA, ENZIMA QUE SE ENCUENTRA CONCENTRADA EN TERMINALES NERVIOSAS²⁷, EL GABA ASÍ FORMADO SERÍA LIBERADO POR DESPOLARIZACIÓN DEPENDIENTE DE Ca^{2+} ^{27, 28}.

EN CONTRASTE LA GAD QUE SE ENCUENTRE EN LA MEMBRANA PRESINÁPTICA SE UNE A ÉSTA EN PRESENCIA DE Ca^{2+} Y USE COMO

SUSTRATO UN GLUTAMATO PROBABLEMENTE PROVENIENTE DEL CICLO DE KREBS, EL GABA SINTETIZADO DE ESTA MANERA SERÍA LIBERADO POR UN PROCESO ACOPLADO A SU SÍNTESIS, PROBABLEMENTE EN AUSENCIA DE DESPOLARIZACIÓN²², ²³.

LA GAD INICIALMENTE FUÉ PURIFICADA DE CEREBRO DE RATÓN²³, Y ACTUALMENTE SE SABE QUE LA GAD TIENE UN PESO MOLECULAR DE 85 KILODALTONS (KD), QUE SU K_m ES DE 0.7 mM PARA EL GLUTAMATO (SUSTRATO DE LA ENZIMA) Y DE 0.05 mM PARA EL FOSFATO DE PIRIDOXAL (PLP), COFACTOR DE LA ENZIMA; EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS AMBAS SUSTANCIAS SE ENCUENTRAN A NIVELES MAYORES Y PODRÍA ESTAR NORMALMENTE SATURADA "IN VIVO"²⁴. USANDO ANTICUERPOS CONTRA ESTA ENZIMA SE HA CONFIRMADO SU LOCALIZACIÓN EN LAS TERMINALES SINÁPTICAS DE LAS NEURONAS GABAÉRGICAS²⁵, ²⁶, ²⁷.

LOS ESTUDIOS CINÉTICOS DE LA GAD HAN DEMOSTRADO QUE EXISTEN DOS FORMAS DIFERENTES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA; UNA DEPENDE DE LA COENZIMA FIRMEMENTE UNIDA A LA APOENZIMA, Y POR CONSIGUIENTE ES INDEPENDIENTE DEL PLP LIBRE Y SE ASOCIA MÁS FÁCILMENTE A LA MEMBRANA, LA SEGUNDA FORMA SE ENCUENTRA SOLUBLE EN EL CITOPLASMA DE LA TERMINAL SINÁPTICA²⁸, ²⁹.

ESTUDIOS DE LA GAD EN DESARROLLO.- SE SABE QUE LA ACTIVIDAD DE LA GAD CEREBRAL SE INCREMENTA DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL EN LA RATA, Y DESPUÉS DE 23 DÍAS LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN TODO EL CEREBRO PERMANECE SIN CAMBIO HASTA LLEGAR EL ANIMAL AL ESTADO ADULTO³⁰.

EN CEREBRO DE RATÓN HAN SIDO REPORTADAS ALGUNAS PROPIEDADES DE LA GAD, COMO SU SENSIBILIDAD A LA HIPOTONICIDAD, A TRITON X-100 EL CUAL ES UN DETERGENTE, A PROPIEDADES DE SEDIMENTACIÓN, A PREINCUBACIÓN A 37 °C, HABIENDO DIFERENCIAS ENTRE LA GAD DE

RECIÉN NACIDOS Y LA ENZIMA DE ANIMALES ADULTOS. LA ENZIMA DE LOS RECIÉN NACIDOS FUE INACTIVADA POR ESTOS PROCEDIMIENTOS, MIENTRAS QUE LA ENZIMA PRESENTE EN LOS ADULTOS NO ES AFECTADA²⁴. ESTA SENSIBILIDAD DISMINUYE PROGRESIVAMENTE DURANTE EL DESARROLLO; ESTO PUEDE SER PORQUE LA PROTEÍNA DE LA ENZIMA INMADURA SUFRE CAMBIOS DURANTE EL DESARROLLO O BIÉN, ÉSTA ES REEMPLAZADA POR UNA FORMA MADURA²⁷. ADEMÁS, LA ACTIVACIÓN DE LA GAD DE RECIÉN NACIDOS POR CONCENTRACIONES SATURANTES DE PLP ES MENOR QUE EN LA ENZIMA DE LOS ADULTOS, SUGIRIENDO QUE LAS DIFERENCIAS EN SENSIBILIDAD PUEDEN ESTAR RELACIONADAS CON EL GRADO DE SATURACIÓN POR LA COENZIMA²⁷.

LA GAD EN RATÓN DE RECIÉN NACIDOS Y DE ADULTOS HA SIDO PARCIALMENTE PURIFICADA²². EN AMBOS CASOS SE OBTUVIERON 2 PICOS DE ACTIVIDAD DE LA GAD, LOS CUALES FUERON SEPARADOS POR UN GEL DE FILTRACIÓN Y POR GEL DE ELECTROFORESIS, UN PICO CON UN PESO MOLECULAR DE 200 KD Y OTRO CON UN PESO DE 85 KD, A UN PH ÓPTIMO DE 6.5 Y UNA KM ENTRE 1 Y 2 M^{120} .

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD. - LA TÉCNICA QUE CON MAYOR FRECUENCIA SE UTILIZA PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA GAD CONSISTE EN LA DETERMINACIÓN MANOMÉTRICA DE $^{14}CO_2$ LIBERADO POR LA DESCARBOXILACIÓN DEL ACIDO GLUTÁMICO, UTILIZANDO COMO SUSTRATO GLUTAMATO MARCADO CON [^{14}C] ²⁸. UN SEGUNDO PROCEDIMIENTO QUE SE HA DICHO PODRÍA SER MÁS EXACTO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA GAD CONSISTE EN EL ANÁLISIS DEL GABA FORMADO. ESTE PUEDE DETERMINARSE DE VARIAS MANERAS. EN ESTE TRABAJO UTILIZAMOS LAS REACCIONES ACOPLADAS DE LA GABA-T Y DE LA DESHIDROGENASA DEL SEMIALDEHIDO SUCCÍNICO (SSADH), QUE ORIGINAN UN NÚMERO EQUIVALENTE DE MOLES DE

NADPH^o A LOS DE GABA ORIGINALMENTE PRESENTE.

II) LA GABA- α -CETOGLUTARATO TRANSAMINASA (GABA-T, EC 1.2.1.24), ES LA PRIMERA ENZIMA DEL CATABOLISMO DEL GABA, EN UNA REACCIÓN REVERSIBLE DE TRANSAMINACIÓN, QUE CONVIERTE AL GABA EN SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO. ESTA ENZIMA TAMBIÉN REQUIERE PLP COMO COENZIMA, DE MANERA QUE ESTE COMPUESTO ES NECESARIO PARA LA SÍNTESIS Y LA DEGRADACIÓN DEL GABA. LA GABA-T ESTÁ CASI SATURADA DE COENZIMA EN EL SNC, Y SE ENCUENTRA MÁS SÓLIDAMENTE UNIDA A ELLA QUE LA GAD AL PLP.

LA GABA-T SE HA PURIFICADO DEL CEREBRO DE RATÓN Y SE HAN PREPARADO ANTICUERPOS CONTRA ÉSTA⁴¹, TIENE UN PESO MOLECULAR DE 109 KD, Y SU KM ES PARA EL GABA ES DE 1.1 mM⁴². LA DISPONIBILIDAD DE α -CETOGLUTARATO JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE EN LA DEGRADACIÓN DEL GABA. CUANDO OCURRE LA MUERTE DEL ANIMAL LOS NIVELES DE α -CETOGLUTARATO DISMINUYEN RÁPIDAMENTE, EL GABA NO PUEDE SER DEGRADADO Y CONTINÚA FORMÁNDOSE A PARTIR DEL GLUTAMATO. ES DECIR, DESPUÉS DE LA MUERTE OCURRE UN AUMENTO RÁPIDO EN LAS CONCENTRACIONES CEREBRALES DEL GABA, ACOMPAÑADO DE UN DESCENSO DE LOS NIVELES DEL GLUTAMATO⁴². MILLER Y COL.⁴³ REPORTARON QUE, MUY POCO TIEMPO DESPUÉS DE LA MUERTE DEL ANIMAL SE PRODUCE UN AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE LA GAD SATURADA POR PLP, SUGIRIENDO QUE ESTA ACTIVACIÓN POST-MORTEN DE LA GAD CEREBRAL PUEDE SER PRODUCIDA COMO CONSECUENCIA DE LOS RÁPIDOS CAMBIOS POST-MORTEM DE LOS NIVELES DE LOS NUCLEÓTIDOS DE LA ADENINA, QUE "IN VIVO" INHIBEN LA ASOCIACIÓN DEL COFACTOR CON LA ENZIMA.

LA GABA-T ESTÁ UNIDA A LAS MITOCONDRIAS LIBRES LOCALIZADAS

EN TRES COMPARTIMENTOS: TERMINALES, SINAPTICAS CÉLULAS GLIALES Y PROCESOS NEURONALES POSTSINAPTICOS. EN LA TERMINAL, LA GABA-T PARTICIPA EN EL MANTENIMIENTO DE LAS CONCENTRACIONES DEL GABA, MIENTRAS QUE EN LOS OTROS DOS INTERVIENE EN LA DESTRUCCIÓN DEL GABA, DESPUÉS DE QUE ESTE NEUROTRANSMISOR HA SIDO LIBERADO.

III) LA DESHIDROGENASA DEL SEMIALDEHIDO SUCCINICO (SSADH, EC 1.2.2.24). LA SSADH ES LA ENZIMA FINAL DE LA VÍA DEGRADATIVA DEL GABA Y RESPONSABLE DE LA OXIDACIÓN DEL SEMIALDEHIDO SUCCÍNICO (SSA), A SUCCINATO, EL CUAL VUELVE A ENTRAR AL CICLO DE KREBS (FIG.4)²².

ESTA ENZIMA HA SIDO IDENTIFICADA EN TEJIDO CEREBRAL DE ALGUNAS ESPECIES ANIMALES INCLUYENDO EL GATO, LA RATA, EL MONO Y EL HOMBRE. LA SSADH ES UNA ENZIMA MITOCONDRIAL Y SU DISTRIBUCIÓN ES SIMILAR A LA DE LA GABA-T, (FIG.4).

SE SABE QUE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA AUMENTA APROXIMADAMENTE TRES VECES DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL DE LA RATA²³, MIENTRAS QUE LA GAD Y LA GABA-T MUESTRAN UN INCREMENTO HASTA DE 8 VECES EN SU ACTIVIDAD²⁴, ESTE INCREMENTO ES MAYOR ENTRE LOS 10 Y 20 DÍAS²⁵.

LA CONCENTRACIÓN DE SSA CEREBRAL PARECE SER MUY BAJA, APROXIMADAMENTE 0.05 A 0.1 NMOL/G DE TEJIDO CEREBRAL DE RATÓN. ESTO HACE PENSAR QUE EL CATABOLISMO DEL SSA NO ES EL PASO LIMITANTE EN LA VÍA FINAL DEL GABA, Y QUE LA ACTIVIDAD DE LA SSADH ES MÁS ALTA QUE LA DE LA GABA-T. POR OTRO, LADO SE HA ENCONTRADO QUE LA ACTIVIDAD DE LA SSADH CON RESPECTO A LA GABA-T ES 5 VECES MAYOR EN LA RATA, Y DE 1.8 A 1.5 VECES EN CEREBRO HUMANO²⁶.

SE HA PURIFICADO LA SSADH DEL CEREBRO DE RATA, ASÍ COMO DEL

CEREBRO HUMANO. ESTUDIOS ESTRUCTURALES MUESTRAN QUE LA SSADH EN LA RATA TIENE UN PESO MOLECULAR DE 140 KD Y QUE SE ENCUENTRA COMPUESTA DE DOS SUBUNIDADES DE IDÉNTICOS PESOS MOLECULARES.

EXPERIMENTALMENTE SE HA CALCULADO LA KM PARA EL NAD, QUE ES DE 2×10^{-5} M Y PARA SSA DE 1×10^{-4} M. SU PH ÓPTIMO ES DE 8.6[±].

EN CEREBRO DE HUMANOS SE ENCONTRÓ QUE LA SSADH ESTA FORMADA POR DOS DÍMEROS, CON UN PESO MOLECULAR DE 145 KD, COMPUESTOS DE UNA MANERA SIMILAR PERO NO IDÉNTICOS EN SUS SUBUNIDADES. EL PH ÓPTIMO, AL IGUAL QUE EN LA SSADH DE LA RATA, FUE DE 8.6, PERO LAS ENZIMAS A ESE PH NO FUERON MUY ESTABLES, POR LO QUE LAS DETERMINACIONES CINÉTICAS FUERON HECHAS A PH 7.2, RESULTANDO UNA KM PARA EL NAD DE 1.85×10^{-5} Y DE 2×10^{-4} PARA EL SSA[±].

LA GABA-T Y LA SSADH SON ENZIMAS MITOCONDRIALES Y LA GAD SE ENCUENTRA SOLUBLE EN EL CITOPLASMA.

D) VITAMINA B₆ Y EL FOSFATO DE PIRIDOXAL.

SE LE LLAMA VITAMINA B₆ (B₆) A UNA SERIE DE COMPUESTOS DERIVADOS DE LA 2-METIL-3-HIDROXI-5-HIDROXIMETILPIRIDINA. ESTOS COMPUESTOS SE CONOCEN COMO VITÁMEROS, PORQUE TIENEN LA MISMA ACTIVIDAD VITAMÍNICA QUE LA B₆, SON: EL ALCOHOL PIRIDOXINA [2-METIL-3-HIDROXI-4, 5-BIS-(HIDROXIMETIL)-PIRIDINA], EL ALOEHIDO, PIRIDOXAL (3-HIDROXI-5-HIDROXIMETIL)-2-METILISONICOTALDEHIDO), Y LA AMINA PIRIDOXAMINA (2-METIL-3-HIDROXI-4-AMINO METIL-5-HIDROXIMETIL-PIRIDINA).

LOS FOSFATOS DE ESTOS TRES COMPUESTOS SON TAMBIÉN VITÁMEROS. LA B₆ FUE IDENTIFICADA, COMO UN FACTOR DE LA DIETA CAPAZ DE CURAR EN LA RATA UNA DERMATITIS CONOCIDA COMO ACRODINIA. EN 1938 LA B₆ FUE AISLADA EN FORMA PURA A PARTIR DEL ARROZ Y DE LA

LEVADURA. EN 1942 SNELL Y COL., (CITADO EN²⁷) DESCUBRIERON AL PIRIDOXAL Y LA PIRIDOXAMINA COMO LOS AGENTES MÁS POTENTES PARA EL CRECIMIENTO BACTERIANO, Y COMO PRECURSORES MÁS DIRECTOS DE LAS FORMAS ACTIVAS DE ESTA VITAMINA.

EL VITÁMERO METABÓLICAMENTE ACTIVO COMO COENZIMA ES EL FOSFATO DE PIRIDOXAL (FIG. 6).

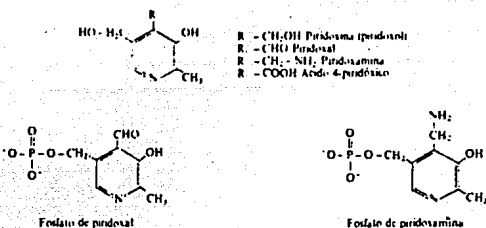


FIG. 6. VITÁMEROS DE LA B₆ Y PRODUCTOS DE SU METABOLISMO. (TOMADO DE²⁸).

EL FOSFATO DE PIRIDOXAL SE OBTIENE MEDIANTE LA FOSFORILACIÓN DEL PIRIDOXAL POR ACCIÓN DE UNA CINASA ESPECÍFICA. CON EXCEPCIÓN DEL GRUPO DE LAS ENZIMAS AMINOTRANSFERASAS QUE PUEDEN USAR FOSFATO DE PIRIDOXAL Y FOSFATO DE PIRIDOXAMINA, TODAS LAS ENZIMAS DEPENDIENTES DE LA B₆ REQUIEREN ESPECÍFICAMENTE FOSFATO DE PIRIDOXAL, POR LO QUE LOS OTROS VITÁMEROS DEBEN CONVERTIRSE EN ÉSTE (FIG. 7)²⁹.

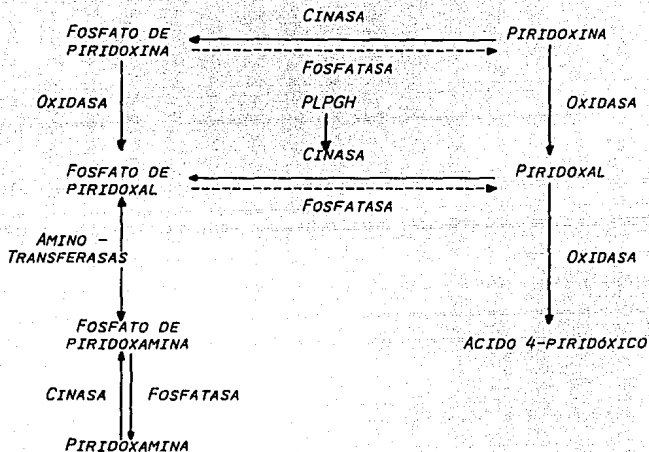


FIG. 7. INTERCONVERSIONES DE LOS VITÁMEROS B₆ Y DERIVADOS. (TOMADO DE¹⁰).

EN AVES Y MAMÍFEROS, INCLUYENDO AL HOMBRE, CON UNA SEVERA DEFICIENCIA DE VITÁMEROS DE B₆ TIENE COMO CONSECUENCIA LA APARICIÓN DE CONVULSIONES, LAS CUALES SON CONTROLADAS POR SUPLEMENTO DE B₆. EL REQUERIMIENTO NUTRICIONAL DEL HOMBRE DE LA B₆ FUE ESTABLECIDO EN 1954, DEBIDO A LA EPIDEMIA OCURRIDA EN MAS DE 500 INFANTES QUE SUFRIERON CRISIS CONVULSIVAS DESPUES DEL USO DE UN LIQUIDO ALIMENTICIO PARA INFANTES QUE INADVERTIDAMENTE NO SE HABÍA COMPLEMENTADO CON B₆ DURANTE SU ELABORACIÓN. ALGUNOS

DE ESTOS INFANTES FUERON ESTUDIADOS EN DETALLE POR COURSI¹⁹, QUIEN REPORTÓ LA DESPARICIÓN DE LOS ATAQUES Y LA NORMALIZACIÓN DEL EEG EN POCOS MINUTOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE B₆ EN FORMA DE PIRIDOXINA-HCL. TAMBIÉN EN 1954, EL PRIMER CASO DE DEPENDENCIA DE B₆ FUE REPORTADO POR HUNT Y COLABORADORES (CITADO EN²⁰). LOS INFANTES DESARROLLARON ATAQUES EN EL PERÍODO NEONATAL, QUE NO RESPONDIÓ A LOS ANTICONVULSIVANTES USUALES Y QUE FUE COMPLETAMENTE CONTROLADA CON UNA DOSIS DIARIA DE 10 MG DE B₆ (COMO PIRIDOXINA).

3. EL GABA Y SU RELACION CON LA PRODUCCION DE CONVULSIONES

LAS CONVULSIONES REPRESENTAN UNA MANIFESTACIÓN DEL SNC CUANDO LA ACTIVIDAD EXCITADORA EXCEDE LA CAPACIDAD DEL TEJIDO NERVIOSO PARA MODULARLA. LA ACCIÓN DE LOS NEUROTRANSMISORES INHIBIDORES ES OBTIAMENTE IMPORTANTE PARA BALANCEAR LAS INFLUENCIAS DESPOLARIZANTES DEL FLUJO CATIONICO PASIVO Y DE LOS NEUROTRANSMISORES EXCITADORES. LOS EFECTOS EXCITADORES E INHIBIDORES CONSTANTEMENTE INTERACTÚAN SOBRE LA MEMBRANA NEURONAL, Y PARTICIPAN CONJUNTAMENTE EN EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN EN EL SNC.

ES IMPORTANTE SEÑALAR QUE LA INHIBICIÓN PARECE SER UNA DE LAS PRINCIPALES FORMAS DE CONTROL DE LA FUNCIÓN DEL SNC. POR EJEMPLO LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA CEREBRAL Y DEL HIPOCAMPO SE ENCUENTRAN PRÁCTICAMENTE CUBIERTAS DE TERMINALES DE NEURONAS GABAÉRGICAS QUE ACTÚAN SOBRE ELLAS. ES DECIR, LAS NEURONAS PIRAMIDALES ESTAN FUERTEMENTE INHIBIDAS POR LA ACCIÓN DE OTRAS NEURONAS INHIBIDORAS, Y MEDIANTE UNA DESINIBICIÓN, LAS

NEURONAS DE ESE SECTOR PUEDEN SER LIBERADAS PARA QUE DESCARGUEN A UNA VELOCIDAD Y SECUENCIA DIFERENTES²⁰.

PARA CONSIDERAR EL PAPEL DE LAS NEURONAS GABAÉRGICAS EN LA EPILEPSIA CORTICAL FOCAL, FUE NECESARIO DETERMINAR INICIALMENTE SI LAS NEURONAS GABAÉRGICAS DISMINUYEN EN NÚMERO, O SI SUS RELACIONES CON OTRAS NEURONAS ESTÁN ALTERADAS MORFOLÓGICAMENTE²¹.

ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA HECHOS EN CORTEZA SENSITIVA Y MOTORA DE MONOS EPILÉPTICOS, PERMITIERON CORRELACIONAR LA ACTIVIDAD EPILÉPTICA CON EL NÚMERO DE TERMINALES GABAÉRGICAS²², OBSERVÁNDOSE UNA DISMINUCIÓN SIGNIFICATIVA EN EL NÚMERO DE TERMINALES POSITIVAS PARA LA GAD EN LOS SITIOS EPILÉPTOGENICOS. ESTOS RESULTADOS LO QUE APOYA LA HIPÓTESIS DE QUE UNA PÉRDIDA RELATIVAMENTE SELECTIVA DE LAS NEURONAS INHIBIDORAS GABAÉRGICAS, PUDIERA SER RESPONSABLE DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA ACTIVIDAD CONVULSIVA OBSERVADA EN EL FOCO EPILÉPTICO. ESTAS OBSERVACIONES SON PARTICULARMENTE IMPORTANTES, YA QUE MUCHAS EPILEPSIAS EN HUMANOS SON CAUSADA POR LESIONES CEREBRALES PRODUCIDAS POR TRAUMATISMOS, TUMORES Y ANGIOMAS. ESTAS CONDICIONES PUEDEN INTERFERIR CON EL FLUJO NORMAL DE LA SANGRE A UNA REGIÓN EN PARTICULAR, PROPICIANDO LA MUERTE CELULAR.

POR OTRA PARTE, LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA NO ES ATRAVESADA POR EL GLUTAMATO NI POR EL GABA. POR ESTA RAZÓN, CUANDO SE ADMINISTRAN ESTOS COMPUESTOS, NO SE ALTERAN LAS CONCENTRACIONES DE GABA EN EL CEREBRO. LA GLUTAMINA Y LA PIRIDOXINA, SI ATRAVIESAN LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y SU ADMINISTRACIÓN TAMPOCO MODIFICA EL CONTENIDO CEREBRAL DE GABA, ESTE HALLAZGO INDICA QUE LOS NIVELES TISULARES NORMALES DEL PRECURSOR Y DEL COFACTOR SON SUFICIENTES PARA SATURAR LA ENZIMA DE SÍNTESIS DEL

GABA²⁰, POR OTRA PARTE, LA SÍNTESIS DEL GABA PUEDE SER RETARDADA O BLOQUEADA SI SE INTERFIERE CON LA ACTIVIDAD DE LA GAD²¹.

ALGUNOS DE LOS MECANISMOS PARA LOGRAR ESTO SON LOS SIGUIENTES:

1.- INHIBICIÓN COMPETITIVA DE LA UNIÓN DEL COFACTOR A LA GAD CON ANTAGONISTAS DE PLP COMO SON LA METOXIPIRIDOXINA Y DESOXIPIRIDOXINA²² ²³.

2.- INACTIVACIÓN DEL PLP POR LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS ESTABLES PLP-HIDRAZIDAS²⁴.

3.- INHIBICIÓN COMPETITIVA CON EL SUSTRATO GLUTAMATO, CON ACIDO 3-MERCAPTOPROPIÓNICO²⁵ ²⁶ ²⁷.

EL ACIDO-3-MERCAPTOPROPIÓNICO SE UTILIZA CON MUCHA FRECUENCIA PARA LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE GABA "IN VIVO". LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE UNA DOSIS MODERADA DE ESTA DROGA EN RATAS, INHIBE LA ACTIVIDAD DE LA GAD CEREBRAL Y PRODUCE UN AUMENTO NOTABLE DE LA ACTIVIDAD MOTORA. SI SE UTILIZA UNA DOSIS MAYOR OCURREN CONVULSIONES, PARALELAMENTE A LA INHIBICIÓN DE LA GAD, PERO NO A LA DISMINUCIÓN DEL GABA CEREBRAL²⁸.

II. ANTECEDENTES INMEDIATOS DEL ESTUDIO

A. γ -GLUTAMIL HIDRAZONA DEL FOSFATO DE PIRIDOXAL (PLPGH).

LA PLPGH ES UNA DROGA CON PROPIEDADES INTERESANTES. SE SABE QUE ESTA DROGA AL SER ADMINISTRADA EN RATONES POR VÍA SISTÉMICA, CAUSA SEVERAS CONVULSIONES, AL MISMO TIEMPO QUE DISMINUYE LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN UN 42 % Y LA DE LA PIRIDOXAL CINASA, ENCARGADA DE FOSFORILAR AL PIRIDOXAL, EN UN 36 % \Rightarrow .

EN OTRO ESTUDIO PARALELO²⁷ SE OBSERVÓ QUE LA PLPGH EN RATONES TIENE EFECTOS IDÉNTICOS A LOS QUE TIENE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE DOSIS EQUIMOLARES DE γ -GLUTAMIL HIDRAZIDA (GH) Y PLP.

LA HIDRAZIDA SE COMBINA CON EL EL GRUPO CARBONILO DE PLP, COMPORTANDOSE COMO INHIBIDOR COMPETITIVO DE LA GAD.

LA PLPGH "IN VIVO" RESULTA DE LA COMBINACIÓN DE LA GH Y EL PLP, PRODUCIENDO CONVULSIONES Y DISMINUYENDO LA CONCENTRACIÓN DE GABA CEREBRAL POR INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD.

EL MECANISMO DE ACCIÓN SUGERIDO PARA ESTA DROGA ES QUE LA INHIBICIÓN "IN VIVO" DE LA PIRIDOXAL CINASA INTERUMPE EL SUPLEMENTO DE LA COENZIMA EN SU FORMA ACTIVA (PLP), LO CUAL ES RESPONSABLE DE LA APARICIÓN DE CONVULSIONES^{28, 29} POR LA CONSECUENTE INHIBICIÓN DE LA GAD.

LA RELACIÓN ENTRE LA SUSCEPTIBILIDAD A CONVULSIONES, EL CONTENIDO DE PLP, LA ACTIVIDAD DE LA PIRIDOXAL CINASA Y LA ACTIVIDAD DE LA GAD FUERON ESTUDIADAS EN CEREBRO DE RATÓN DURANTE DESARROLLO POSNATAL, UTILIZANDO PLPGH, SE ENCONTRÓ QUE LA ACTIVIDAD DE LA PIRIDOXAL CINASA Y LOS NIVELES DE PLP DISMINUYÓ EN LAS EDADES ESTUDIADAS. LA ACTIVIDAD DE LA GAD FUE INHIBIDA EN

ANIMALES DE 2 Y 5 DIAS EN MENOS DE UN 25 % Y APROXIMADAMENTE 50 % EN ANIMALES CON MAYOR EDAD. LA ACTIVACIÓN POR PLP "IN VITRO" FUE MENOR EN HOMOGENADOS DE CEREBRO DE ANIMALES DE 2 Y 5 DIAS DE EDAD QUE EN LAS DEMÁS EDADES²⁴. SIN EMBARGO, UN HALLAZGO IMPORTANTE ES QUE EN ANIMALES ADULTOS LA T-GLUTAMIL HIDRAZONA INHIBE LA GAD MUCHO MENOS EN LA RATA QUE EN EL RATÓN²⁵.

LA PLPGH SE HA INYECTADO EN RATAS ADULTAS A DOSIS QUE DISMINUYERON LA ACTIVIDAD DE LA GAD ENTRE UN 18 % Y UN 20 %, SIN CAUSAR CONVULSIONES, A DIFERENCIA DE LO QUE OCURRE EN EL RATÓN. ESTA INHIBICIÓN OCURRE EN AUSENCIA DE PLP EXÓGENO, Y PUEDE REVERTIRSE AÑADIENDO ESTA COENZIMA²⁶. ²⁷.

III. OBJETIVO.

EN VIRTUD DE LOS ANTECEDENTES REVISADOS, SE CONSIDERÓ DE INTRÉS ESTUDIAR EL EFECTO DE LA T-GLUTAMIL HIDRAZONA DEL FOSFATO DE PIRIDOXAL DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL DE LA RATA, CON EL FIN DE EVALUAR SUS EFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GAD CEREBRAL Y SU RELACIÓN CON LA APARICIÓN DE CONVULSIONES. ESTE ES EL OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO.

IV. MATERIALES Y METODOS.

LA T-GLUTAMIL HIDRAZONA DEL FOSFATO DE PIRIDOXAL (PLPGH) FUE SINTETIZADA EN EL LABORATORIO COMO PREVIAMENTE FUE DESCRITO POR TAPIA Y COLABORADORES²⁷.

TODOS LOS COMPUESTOS QUÍMICOS UTILIZADOS, TALES COMO LA SALES, ENZIMAS Y COENZIMAS, SE OBTUVIERON COMERCIALMENTE.

SE UTILIZARON RATAS WISTAR DE 2, 5, 10, 15, 20, 25 Y 30 DÍAS DE EDAD DE AMBOS SEXOS Y RATAS MACHOS DE 90 DÍAS DE EDAD CON UN PESO APROXIMADO DE 200 G.

A. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.

LOS ANIMALES FUERON DIVIDIDOS EN 2 GRUPOS; AL PRIMERO SE LE INYECTÓ (PLPGH) INTRAPERITONEALMENTE (I.P.), LA CUAL FUE DISUELTA EN AGUA (16 MG/ML) E INYECTADA A UNA DOSIS DE 80 MG/KG DE PESO. EL OTRO GRUPO FUE EL CONTROL AL CUAL SE LES INYECTÓ SOLUCIÓN SALINA AL 0.9% .

LOS ANIMALES INYECTADOS CON LA DROGA FUERON DECAPITADOS EN EL MOMENTO QUE PRESENTARON LA PRIMERA CONVULSIÓN TÓNICO-CLÓNICA GENERALIZADA. EN EL CASO DE LAS RATAS QUE NO PRESENTARON CONVULSIÓN, FUERON SACRIFICADOS A TIEMPOS EQUIVALENTES A LOS DE LOS ANIMALES QUE SÍ PRESENTARON LAS CONVULSIONES, AL IGUAL QUE LOS ANIMALES CONTROLES.

LOS CEREBROS SE EXTRAJERON Y FUERON HOMOGENIZADOS, SIN INCLUIR EL PUENTE NI EL CEREBELO, EN BUFFER DE FOSFATOS DE Na^+ 50 mM, PH 6.4, A 4°C.

LA ACTIVIDAD DE LA GAD FUE VALORADA POR DOS MÉTODOS: EL RADIOQUÍMICO, Y EL ENZIMÁTICO, QUE SE DESCRIBIRÁN A CONTINUACIÓN.

LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO NMOLAS/MG PROTEINA POR 20 MINUTOS DE INCUBACIÓN. LA PROTEÍNA SE DETERMINÓ POR EL MÉTODO DE LOWRY¹¹. PARA COMPROBAR LOS EFECTOS DE LA PLPGH, LOS DATOS OBTENIDOS SE COMPARARON ESTADÍSTICAMENTE CONTRA LOS DATOS OBTENIDOS DE LOS ANIMALES CONTROLES MEDIANTE LA PRUEBA *t* DE STUDENT.

1. METODO RADIOQUIMICO.

PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD DE LA GAD POR ESTE MÉTODO, SE UTILIZÓ LA TÉCNICA DE ALBERS Y BRADY¹² CON ALGUNAS MODIFICACIONES, Y CONSISTIÓ EN LO SIGUIENTE:

SE INCUBARON 25 μ L DEL HOMOGENADO DE TEJIDO EN UN TUBO A DE CRISTAL PYREX DE 0.25 ML DE VOLUMEN, QUE CONTENÍA 29 μ L DE BUFFER DE FOSFATOS DE Na^+ 50 mM, 0.05 μ CI DE $[^{14}\text{C}]$ -GLUTAMATO 12 mM, EN PRESENCIA O AUSENCIA DE 8 μ L PLP (0.1 mM DE $[]$ FINAL). EN UN TUBO B DE LAS MISMAS CARACTERÍSTICAS SE COLOCARON 50 μ L DE HYAMINA CON LA FINALIDAD DE QUE ÉSTA ATRAPARA AL $^{14}\text{CO}_2$ LIBERADO, PRODUCTO DE LA DESCARBOXILACIÓN DEL ACIDO GLUTÁMICO MARCAO RADIOACTIVAMENTE. AMBOS TUBOS SE CONECTARON CON UNA MANGUERA DE HULE, Y SE INCUBARON DURANTE 20 MINUTOS A 37°C EN AGITACIÓN CONTÍNUA. LA REACCIÓN FUE DETENIDA INYECTANDO EN EL TUBO A APROXIMADAMENTE 100 μ L DE H_2SO_4 2N PARA DESNATURALIZAR A LA ENZIMA. COMO BLANCO SE INCLUYÓ EN CADA EXPERIMENTO UN TUBO EN LAS MISMAS CONDICIONES ANTERIORES, EN DONDE LA REACCIÓN SE DETUVO A TIEMPO CERO. DESPUÉS DE DETENIDA LA REACCIÓN, LA INCUBACIÓN SE CONTINUÓ POR 1 H., CON EL FIN DE LOGRAR UNA TOTAL DIFUSIÓN DEL $^{14}\text{CO}_2$ LIBERADO. PASADO ESE TIEMPO EL TUBO B SE DEPOSITÓ EN UN VIAL QUE CONTENÍA 10 ML DE LIQUIDO DE CENTELLEO (5 G DE PPO Y 100

MG DE POPOP EN UN LITRO DE TOLUENO), LOS VIALES SE AGITARON PARA QUE EL ^{14}C ATRAPADO POR LA HYAMINA SE DISTRIBUYERA HOMOGÉNEAMENTE, Y LA RADIOACTIVIDAD SE CUANTIFICÓ EN UN CONTADOR DE CENTELLEO PARA MUESTRAS LIQUIDAS.

2. METODO ENZIMATICO

PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD DE LA GAD POR ESTE MÉTODO, SE HIZO UN ANÁLISIS DEL GABA FORMADO, A PARTIR DE GLUTAMATO, DURANTE 20 MIN DE INCUBACIÓN DEL HOMOGENADO DE TEJIDO, A 37°C EN UN BAÑO DE AGITACIÓN CONTINUA, MEDIANTE REACCIONES ACOPLADAS A LA GABA-T Y A LA SSADH^{2*} (GABASA). LAS INCUBACIONES SE HICIERON EN TUBOS DE POLIETILENO DE 1.5 ML PARA MICROFUGA Y LOS VOLÚMENES DE REACTIVOS UTILIZADOS FUERON 10 VECES MAYORES A LOS UTILIZADOS EN EL MÉTODO RADIOMÉTRICO.

SE HIZO UNA CURVA ESTANDAR DE GABA DE LA SIGUIENTE MANERA:

EN CELDILLAS DE CUARZO PARA ESPECTROFOTÓMETRO DE 3.0 ML SE COLOCARON 2.5 ML DE BUFFER DE PIROFOSFATOS DE Na^+ 0.1 M, PH 8.6; 150 μL DE NADP 0.004 M PH 7.0, 100 μL DE MEZCLA ENZIMÁTICA (0.2 UNIDADES DE GABA-T Y SSDH DE PSEUDOMONAS FLUORESCENTES), LA CUAL FUE DISUELTA EN BUFFER DE FOSFATO DE Na^+ , PH 7.6, CON 25% V/V DE GLICEROL, CONCENTRACIONES CONOCIDAS DE GABA DE 6.22, 12.5, 25.0 Y 50 NMOLAS EN UN VOLUMEN DE 100 μL H_2O DESTILADA. LA REACCIÓN SE INICIÓ AGREGANDO 150 μL DE α -CETOGLUTARATO 0.02 M PH 7.9. (TODAS LAS CONCENTRACIONES MENCIONADAS, SON CONCENTRACIONES FINALES EN EL ENSAYO).

SE CUANTIFICÓ EN EL ESPECTROFOTÓMETRO A 340 NM EL INCREMENTO DE LA ABSORBANCIA RESULTANTE DEL NADPH FORMADO POR LAS SIGUIENTES REACCIONES ACOPLADAS:

- A) GABA + α -CETOGLUTARATO $\xrightarrow{\text{GABA-T}}$ SEMIALDEHIDO
 SUCCINICO + GLUTAMATO.
- B) SEMIALDEHIDO SUCCINICO + NADP $\xrightarrow{\text{PBDH}}$ SUCCINATO +
 NADPH + H⁻.

LA CANTIDAD DE NADPH QUE RESULTA DE LA REACCIÓN, ES EQUIVALENTE A LA CONCENTRACIÓN DE GABA EN EL ENSAYO.

PARA CUANTIFICAR LOS NIVELES ENDÓGENOS DE GABA (TIEMPO CERO DEL ENSAYO DE LA GAD), DEL HOMOGENIZADO DE CEREBRO SE TOMÓ UNA ALICUOTA DE 250 μ L Y SE AGREGÓ A UN TUBO EL CUAL CONTENÍA 100 μ L DE ACIDO PERCLÓRICO AL 5%, QUEDANDO A UNA CONCENTRACIÓN FINAL EN EL ENSAYO DE 0.7%.

PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN ANIMALES CONTROLES Y EN ANIMALES TRATADOS CON LA PLPGH, LOS EXPERIMENTOS SE HICIERON EN PRESENCIA O EN AUSENCIA DE PLP EXÓGENO Y LA REACCIÓN FUE DETENIDA DE LA MISMA MANERA QUE LOS CASOS ANTERIORES, AGREGANDO 100 μ L DE ACIDO PERCLÓRICO, DESPUÉS DE HABER ESTADO DURANTE 20 MINUTOS EN INCUBACIÓN A 37°C EN UN BAÑO DE AGITACIÓN CONTINUA, JUNTO CON EL BUFFER DE FOSFATOS DE NA⁺ 50 mM, ACIDO GLUTAMICO 12 mM Y PLP 0.086 mM (CUANDO ESTABA PRESENTE).

UNA VEZ DETENIDA LA REACCIÓN SE CENTRIFUGÓ A 10 000 RPM DURANTE 10 MINUTOS, EL SOBRENADANTE FUE RECUPERADO Y SE LLEVÓ A UN PH ENTRE 6.0 Y 6.3 CON KOH 1N. EL PERCLORATO DE K⁺ FORMADO SE CENTRIFUGÓ EN LAS MISMAS CONDICIONES ANTERIORES, Y EL SOBRENADANTE DE LA SEGUNDA CENTRIFUGACIÓN FUE UTILIZADO PARA CUANTIFICAR LA CONCENTRACIÓN DE GABA.

LOS VOLÚMENES DE LOS SOBRENADANTES UTILIZADOS PARA MEDIR EL

GABA PRODUCIDO FUERON VARIABLES (200 μ L EN LOS ANIMALES DE 5 DÍAS DE EDAD, 150 μ L EN LOS DE 10 DÍAS, 100 μ L PARA LOS ANIMALES DE 15 Y 20 DÍAS, 50 μ L PARA LOS DE 25 Y 30 DÍAS Y 40 μ L PARA LOS DE 90 DÍAS), CORRIGIENDO LOS RESULTADOS POR ESTA VARIABLE.

SE CUANTIFICÓ EN EL ESPECTROFOTÓMETRO A 340 NM EL INCREMENTO DE LA ABSORBENCIA RESULTANTE DEL NADPH, EN PARALELO CON LA CURVA ESTÁNDAR.

EN LA EDAD DE 2 DÍAS NO SE MIDIO EL GABA POR ESTE MÉTODO PORQUE LA TÉCNICA NO SE PUDO AJUSTAR.

V. RESULTADOS

LOS ANIMALES CONTROL QUE RECIBIERON SOLUCIÓN SALINA A LAS DIFERENTES EDADES, EN NINGÚN CASO SUFRIERON ALTERACIONES CONDUCTUALES.

TODAS LAS RATAS DE 20 DÍAS DE EDAD O MENORES, INYECTADAS CON PLPGH, PRESENTARON CONVULSIONES TÓNICO-CLÓNICAS. EN LAS RATAS DE 25 DÍAS LA ACTIVIDAD CONVULSIVA SE PRESENTÓ EN MENOS DEL 30% DE LOS ANIMALES INYECTADOS Y EN ANIMALES DE MAYOR EDAD NUNCA SE PRESENTARON CONVULSIONES.

A. CARACTERÍSTICAS DE LA CONDUCTA PRESENTADA POR LAS RATAS EN LAS DIFERENTES EDADES.

EN LA TABLA I SE MUESTRAN CUANTITATIVAMENTE LOS RESULTADOS CONDUCTUALES. A CONTINUACIÓN SE SEÑALAN LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS CONVULSIONES.

RATAS DE 2 DÍAS DE EDAD.- DEPUÉS DE 60 MIN DE LA INYECCIÓN DE PLPGH LAS RATAS MOSTRARON HIPERACTIVIDAD. A LOS 90 MIN SE OBSERVÓ PÉRDIDA DEL CONTROL POSTURAL, DESPLAZAMIENTO CON EL CUERPO PEGADO AL PISO DE LA JAULA, RIGIDEZ DE EXTREMIDADES Y DE LA COLA, Y TEMBLORES EN TODO EL CUERPO. APROXIMADAMENTE A LAS DOS HORAS SE PRESENTARON CONVULSIONES TÓNICO-CLÓNICAS, CON MOVIMIENTOS LATERALES DE LA CABEZA.

RATAS DE 5 DÍAS DE EDAD.- A ESTA EDAD LOS ANIMALES MOSTRARON SÍNTOMAS MUY PARECIDOS A LOS DE LAS RATAS DE 2 DÍAS, CON LA DIFERENCIA DE QUE LAS CONVULSIONES SE PRESENTARON MEDIA HORA ANTES Y SE ACOMPAÑARON DE CHILLIDOS.

RATAS DE 10 DÍAS DE EDAD.- LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES EN LOS ANIMALES A ESTA EDAD SE EMPEZARON A NOTAR A LOS 30 MIN DE LA INYECCIÓN DE PLPGH: INQUIETUD, PILOERECCIÓN, TEMBLORES LATERALES DE LA CABEZA Y CONDUCTA DE ACICALAMIENTO. ÉSTOS SÍNTOMAS DURARON ENTRE 15 Y 25 MINUTOS Y FUERON SEGUIDOS POR CONTRACCIONES CLÓNICAS ESPORÁDICAS, CHILLIDOS Y FINALMENTE SE PRESENTÓ LA CONVULSIÓN TÓNICO-CLÓNICA GENERALIZADA, UNA HORA APROXIMADAMENTE DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA DROGA.

RATAS DE 15 DÍAS DE EDAD.- LOS ANIMALES PRESENTARON LOS MISMOS SÍNTOMAS QUE EN LA EDAD ANTERIOR, EN TIEMPOS SIMILARES, PERO LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES FUERON MÁS EVIDENTES. EL TIEMPO PROMEDIO EN APARECER LA CONVULSIÓN GENERALIZADA DISMINUYÓ 7 MINUTOS CON RESPECTO A LA EDAD ANTERIOR.

RATAS DE 20 DÍAS DE EDAD.- LA CONDUCTA PRESENTADA A ESTA EDAD FUE MUY PARECIDA A LA DE LOS ANIMALES DE 15 DÍAS.

RATAS DE 25 DÍAS DE EDAD.- A ESTA EDAD LA DROGA YA NO TIENE UN EFECTO TAN MARCADO COMO EN LAS EDADES ANTERIORES. SÓLO EL 27% DE LOS ANIMALES PRESENTARON CONVULSIONES A UN TIEMPO PROMEDIO DE 52 MIN, TENIENDO UN COMPORTAMIENTO CONDUCTUAL PARECIDO AL QUE TUVIERON LOS ANIMALES DE 15 Y 20 DÍAS. LOS ANIMALES QUE NO PRESENTARON CONVULSIONES, SOLAMENTE PRESENTARON PILOERECCIÓN Y ESPORÁDICAMENTE CONDUCTA DE ACICALAMIENTO. TRANSCURRIDA UNA HORA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA DROGA LOS ANIMALES SE MOSTRABAN CONDUCTUALMENTE TRANQUILOS, E INCLUSIVE ALGUNOS ANIMALES SE QUEDABAN DORMIDOS. ANTES DE REALIZAR ESTOS EXPERIMENTOS ALGUNOS ANIMALES FUERON INYECTADOS CON LA PLPGH SOLAMENTE CON EL FÍN DE OBSERVAR SU CONDUCTA, LOS QUE NO CONVULSIONABAN SE OBSERVARON INCLUSO MÁS DE 2 HRS.

RATAS DE 30 DÍAS DE EDAD.- LA DROGA TUVO NINGÚN EFECTO CONDUCTUAL, LAS RATAS SE MOSTRARON TRANQUILAS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA DROGA.

RATAS ADULTAS DE 200 G (90±3 DÍAS).- LOS ANIMALES NO PRESENTARON ALTERACIÓN CONDUCTUAL.

LOS RESULTADOS ANTERIORES SE RESUMEN EN LA TABLA I.

TABLE I. EFECTO CONDUCTUAL DE LA PLPGH EN RATAS EN DESARROLLO.

EDAD (DÍAS)	RATAS INYECTADAS/ RATAS QUE CONVUL.	RANGO DE LATENCIA A LA 1ª CONVUL.	TIEMPO \bar{X} DE LA 1ª CONVUL.
2	14/14	90-136	120.5 ± 14.8
5	19/19	70-110	89.5 ± 12.4
10	26/26	47-85	60.5 ± 9.2
15	17/17	41-66	53.9 ± 9.0
20	20/20	27-83	53.9 ± 9.5
25	20/5	46-73	54.6 ± 11.3
30	18/0	*	-
90	10/0	*	-

LOS RANGOS DE LATENCIA Y TIEMPOS PROMEDIOS ESTAN DADOS EN MINUTOS.

- * RATAS QUE NO PRESENTARON CONDUCTA CONVULSIVA, FUERON DECAPITADAS ENTRE 60 Y 120 MINUTOS. LAS RATAS DE 25 DÍAS QUE NO TUVIERON CONDUCTA CONVULSIVA SE SACRIFICARON DENTRO DEL MISMO PERÍODO DE TIEMPO QUE LOS ANIMALES DE 30 Y 90 DÍAS.

B. ACTIVIDAD DE LA GAD

METODO RADIOQUIMICO.- LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN AUSENCIA DE PLP, EN ANIMALES CONTROLES ES MÍNIMA A LA EDAD DE 2 DÍAS (29.2

NMOL DE CO₂), INCREMENTÁNDOSE PROGRESIVAMENTE DE ACUERDO A LA EDAD. LA ACTIVIDAD MÁXIMA SE OBSERVÓ EN LOS ANIMALES DE 20 DÍAS DE EDAD, (137.2 NMOL) Y A MAYOR EDAD DISMINUYÓ, HASTA ESTABILIZARSE EN LOS ANIMALES ADULTOS (91.3 NMOLAS DE CO₂ POR MG DE PROTEÍNA DURANTE 20 MINUTOS DE INCUBACIÓN), (FIG.8).

EN LOS ANIMALES TRATADOS CON PLPGH DE TODAS LAS EDADES, LA ACTIVIDAD DE LA GAD DISMINUYÓ SIGNIFICATIVAMENTE ($P < 0.05$), CON RESPECTO A LOS ANIMALES CONTROLES, SIENDO MÁS NOTORIO EN RATAS DE 10 Y DE 20 DÍAS CON UNA DISMINUCIÓN DEL 45.5% Y DEL 33.6%, RESPECTIVAMENTE. LOS VALORES DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD POR ESTE MÉTODO SE MUESTRAN EN LA (FIG. 8). LOS VALORES ESTÁN DADOS EN NANOMOLAS DE (¹⁴C-¹⁴CO₂ POR MG DE PROTEÍNA DURANTE 20 MINUTOS DE INCUBACIÓN).

EN PRESENCIA DE PLP, LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN LOS ANIMALES CONTROL SE INCREMENTÓ PROGRESIVAMENTE DE ACUERDO CON LA EDAD, SIENDO MÁXIMA EN LOS ANIMALES DE 30 DÍAS (154.8 NMOL). SE PUEDE CONSIDERAR QUE A LA EDAD DE 20 DÍAS SE ALCANZÓ EL MÁXIMO DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA (135.6 NMOL), PUESTO QUE NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA A ESTA EDAD Y LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA EN LOS ANIMALES ADULTOS.

LA INHIBICIÓN "IN VIVO" DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CAUSADA POR EL TRATAMIENTO CON PLPGH, FUE REVERTIDA "IN VITRO" POR LA ADICIÓN DE PLP EXÓGENO, Y NO SE ENCONTRARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA DE LOS ANIMALES CONTROLES, EXCEPTO A LOS 10 Y 25 DÍAS DE EDAD EN DONDE LA INHIBICIÓN DE LA GAD NO FUE REVERTIDA TOTALMENTE (FIG.9).

METODO ENZIMATICO.- EN AUSENCIA DE PLP, EN LOS ANIMALES CONTROL

LA ACTIVIDAD DE LA GAD FUE MAYOR QUE EN LAS RATAS TRATADAS CON PLPGH. EN LAS CUALES DISMINUYÓ DE MANERA SIGNIFICATIVA EN TODAS LAS EDADES (FIG. 10).

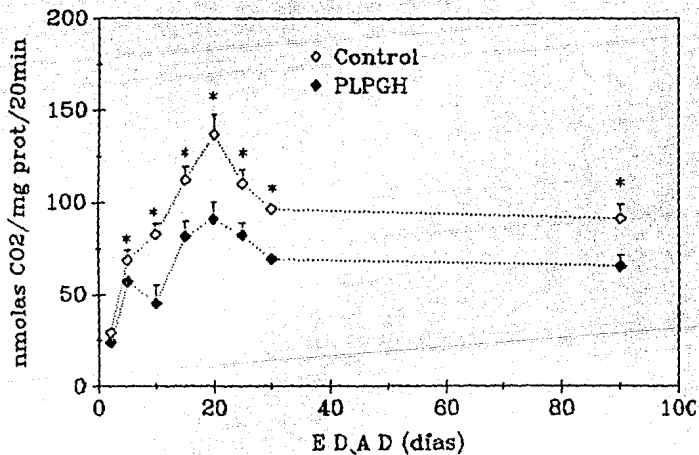


FIG. 8. ACTIVIDAD DE LA GAD SIN PLP POR EL METODO RADIOQUIMICO. EN TODAS LAS EDADES LA ACTIVIDAD DE LA GAD SE ENCUENTRA DISMINUIDA POR EFECTO DE LA PLPGH, CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN LOS ANIMALES CONTROLES. * $P < 0.05$, $N = 5-7$.

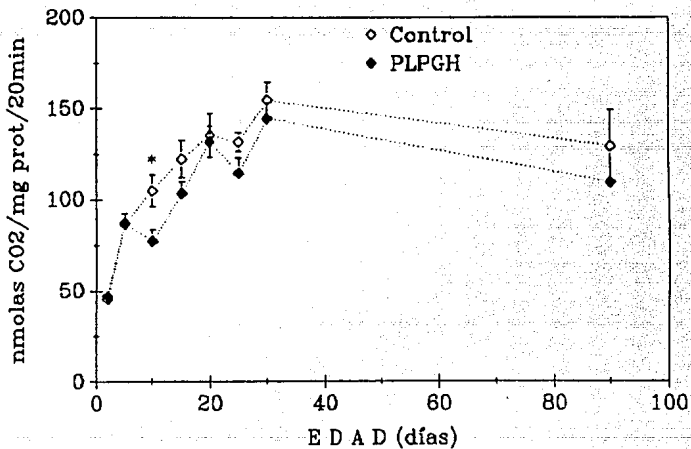


FIG. 9. LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN PRESENCIA DE PLP, POR EL METODO RADIOQUIMICO. LA INHIBICIÓN "IN VIVO" DE LA GAD CAUSADA POR LA PLPGH FUE REVERTIDA POR EXCESO DE PLP "IN VITRO" EN TODAS LAS EDADES, EXCEPTO EN ANIMALES DE 10 DIAS. * $P < 0.05$, $n = 5-7$.

EL INCREMENTO EN LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN LAS RATAS CONTROL RESPECTO A LA EDAD TUVO UN COMPORTAMIENTO MUY PARECIDO AL OBSERVADO CON EL MÉTODO RADIOQUÍMICO, EXCEPTO EN LOS ANIMALES MÁS JÓVENES, YA QUE LA ACTIVIDAD A LOS 5, 10, 15 Y 20 DÍAS FUE DEL 77.6 %, 68.9 %, 48.9 % Y 29.0 % MAYOR, RESPECTIVAMENTE, CON EL MÉTODO RADIOMÉTRICO QUE CON EL MÉTODO ENZIMÁTICO.

LA ACTIVIDAD DE LA GAD SE INHIBIÓ POR EL TRATAMIENTO CON PLPGH EN LOS ANIMALES DE 5 DÍAS DE EDAD (15.4 VS 5.2 NMOL DE GABA PRODUCIDO RESPECTIVAMENTE). EN TODAS LAS DEMÁS EDADES SE OBSERVÓ INHIBICIÓN EN LOS ANIMALES TRATADOS CON PLPGH, AUNQUE EN MENOR PROPORCIÓN (FIG. 10).

EN PRESENCIA DE PLP LA ENZIMA QUE "IN VIVO" FUE INHIBIDA CON PLPGH, SU ACTIVIDAD FUE RESTAURADA CASI AL 100%, EN TODAS LAS EDADES EXCEPTO A LOS 30 DÍAS, EN DONDE HAY UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA EN LOS ANIMALES CONTROLES (FIG. 11).

NIVELES ENDOGENOS DE GABA.- LOS NIVELES ENDOGENOS DE GABA (ES DECIR EL TIEMPO CERO DEL ENSAYO ENZIMATICO), EN LOS ANIMALES TRATADOS CON PLPGH SE ENCONTRARON DISMINUIDOS CON RESPECTO A ANIMALES NO TRATADOS, EN TODAS LAS EDADES ENSAYADAS. LOS PORCENTAJES DE DISMINUCIÓN FUERON : EN 5 DÍAS EL 29.2 %, EN 10 DÍAS 30.3 %, EN 15 DÍAS 13.0 %, EN 20 DÍAS 41.3 %, EN 25 DÍAS 51.1 %, EN 30 DÍAS 32.0 % Y EN LOS ANIMALES DE 90 DÍAS 14.6 % (TABLA.II).

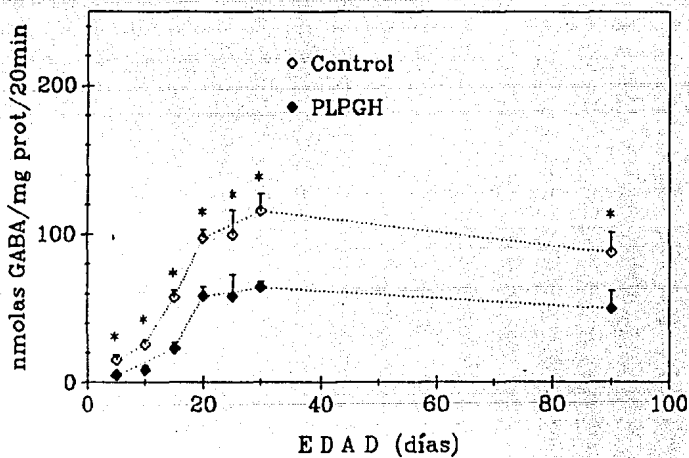


FIG. 10. DETERMINACION DE LA GAD POR EL METODO ENZIMATICO EN AUSENCIA DE PLP. EN TODAS LAS EDADES ESTUDIADAS LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA, EN ANIMALES TRATADOS CON PLPGH, SE ENCUENTRA DISMINUIDA ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAMENTE. * $P < 0.05$. N= 5-7.

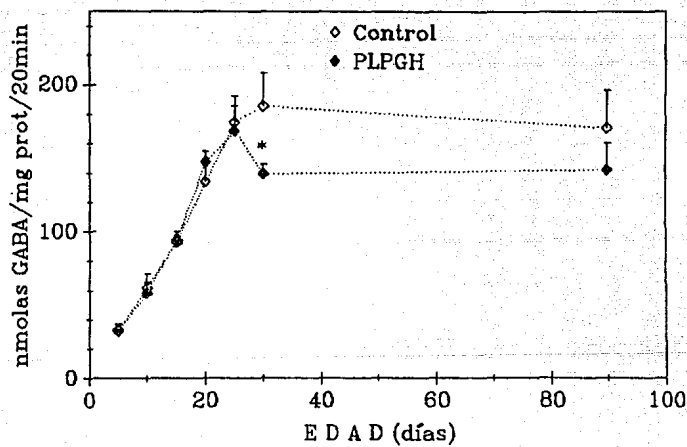


FIG. 11. ACTIVIDAD DE LA GAD POR EL METODO ENZIMATICO EN PRESENCIA DE PLP. LA ACTIVIDAD DE LA GAD QUE FUE INHIBIDA POR LA PLPGH ES REVERTIDA CERCANAMENTE AL 100% EN TODAS LAS EDADES EXCEPTO EN ANIMALES DE 30 DIAS DE EDAD. * $P < 0.05$, $N = 5-7$.

TABLA.II. NIVELES ENDÓGENOS DE GABA MEDIDOS POR EL MÉTODO ENZIMÁTICO EN EL MOMENTO DE LA PRIMERA CONVULSIÓN.

EDAD (DÍAS)	C	H
5	33.5 ± 4.9	*23.7 ± 2.9
10	39.9 ± 3.0	*27.8 ± 5.6
15	33.0 ± 9.0	28.7 ± 8.8
20	50.5 ± 3.4	*29.6 ± 3.4
25	38.9 ± 5.7	*19.0 ± 2.7
30	43.0 ± 2.4	*29.2 ± 2.4
90	67.6 ± 10.7	57.7 ± 6.6

LOS VALORES ESTÁN DADOS EN NMOLAS DE GABA POR MG DE PROTEÍNA Y SON PROMEDIO DE 5 A 7 EXPERIMENTOS ± ES. SIGNIFICATIVO A *P<0.05. C, CONTROL; H, PLPHG.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD .- LOS PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA SE OBTUVIERON TOMANDO EN CUENTA SOLAMENTE LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN AUSENCIA DE PLP Y SE TOMÓ COMO 100% LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN LOS ANIMALES CONTROLES, CALCULÁNDOSE A PARTIR DE AHÍ EL PORCENTJE DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA EN LOS ANIMALES TRATADOS CON PLPGH (FIG.12).

POR EL MÉTODO RADIOQUÍMICO LOS RESULTADOS INDICAN QUE A EDADES TEMPRANAS 2 Y 5, DÍAS LA INHIBICIÓN ES MÍNIMA (18.0% Y 16.9% RESPECTIVAMENTE), Y QUE A LOS 10 DÍAS ES MÁXIMA (45.5%), DISMINUYENDO EN ANIMALES DE MAYOR EDAD A NIVELES MÁS O MENOS CONSTANTES, (FIG.12).

POR EL MÉTODO ENZIMÁTICO LA INHIBICIÓN ES MÁXIMA EN LOS

ANIMALES DE 5 Y 10 DIAS DE EDAD (66.2% Y 66.0%), DISMINUYENDO CONFORME LA EDAD ES MAYOR. LA INHIBICIÓN ES MENOR EN ANIMALES DE 20 Y 25 DIAS, 39.1% Y 41.7% RESPECTIVAMENTE (FIG. 12).

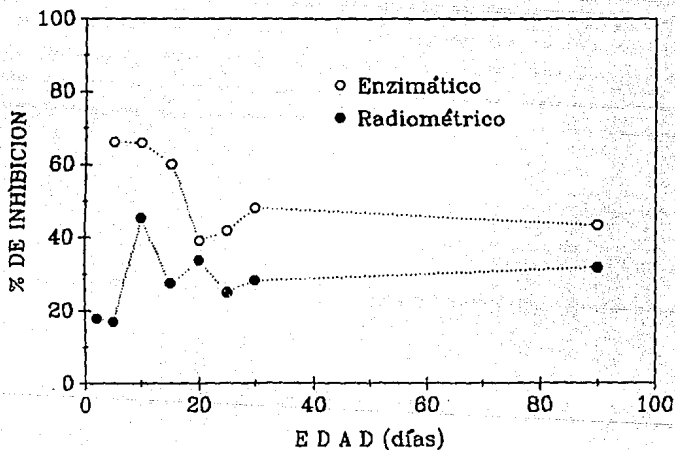


FIG. 12. PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE LA GAD POR LOS MÉTODOS RADIOMÉTRICO Y ENZIMÁTICO. CADA PUNTO ES PROMEDIO DE 5 A 7 EXPERIMENTOS.

PORCENTAJE DE ACTIVACION DE LA GAD. - LOS RESULTADOS SE OBTUVIERON TOMANDO COMO EL 100% LA ACTIVIDAD DE LA GAD SIN PLP, CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CUANDO LOS ENSAYOS SE HICIERON EN PRESENCIA DE PLP, TANTO EN ANIMALES CONTROLES COMO EN ANIMALES INYECTADOS CON PLPGH (TABLA.III).

MÉTODO RADIOMÉTRICO. POR ESTA METODOLOGÍA LOS RESULTADOS MUESTRAN QUE LA ACTIVACIÓN DE LA GAD EN LOS ANIMALES CONTROLES NO GUARDA UNA RELACIÓN DIRECTA CON LA EDAD DE LOS ANIMALES, LO MISMO SUCEDE EN LAS RATAS INYECTADS CON PLPGH (TABLA III).

MÉTODO ENZIMÁTICO. LA ACTIVACIÓN POR ESTE MÉTODO EN TODAS LAS EDADES ES MÁS CLARO QUE POR EL MÉTODO RADIOMÉTRICO, EXCEPTO EN LOS ANIMALES DE 30 DÍAS EN DONDE LA ACTIVACIÓN ES SIMILAR POR AMBAS METODOLOGÍAS (TABLA III). DE LA MISMA MANERA QUE POR EL MÉTODO ANTERIOR, LA ACTIVACIÓN DE LA GAD ES MAYOR EN LOS ANIMALES TRATADOS CON PLPGH RESPECTO A LOS ANIMALES CONTROLES, LLEGANDO A SER CERCANA A UN 600% EN LOS ANIMALES DE 10 DÍAS, DISMINUYENDO CONFORME AUMENTA LA EDAD (ENTRE 200% Y 300%) EXCEPTO EN ANIMALES DE 30 DÍAS EN DONDE LA ACTIVACIÓN ES DE 116.8%. LA ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA EN LOS ANIMALES CONTROLES NO ES TAN PRONUNCIADA, SIENDO LA MÁS ALTA DE 140% EN LOS ANIMALES DE 10 DÍAS, MIENTRAS QUE A EDADES A EDADES MAYORES FLUCTÚA ENTRE 38% Y 95% (TABLA. III).

TABLA. III. PORCENTAJES DE ACTIVACIÓN DE LA GAD.

EDAD (DÍAS)	% DE ACTIVACIÓN			
	•R		•E	
	C	H	C	H
2	56.2	92.9	-	-
5	26.8	52.0	116.8	115.0
10	26.6	71.9	139.9	576.4
15	8.8	26.7	61.6	311.3
20	5.7	43.7	37.7	151.9
25	19.3	39.0	75.0	189.5
30	60.3	107.7	60.0	116.8
90	41.0	67.0	95.0	185.9

- MÉTODO RADIOQUÍMICO (R) Y MÉTODO ENZIMÁTICO (E).
 (C) ANIMALES CONTROLES Y (H) ANIMALES CON PLPGH.
 N= 5-7.

VI. DISCUSION.

MÉTODOS. - LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR AMBOS MÉTODOS, EL RADIOMÉTRICO Y EL ENZIMÁTICO, MUESTRAN QUE LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN RATAS CONTROLES SE INCREMENTA CONFORME LA EDAD DE LOS ANIMALES ES MAYOR, HASTA LOS 20 DÍAS. POSTERIORMENTE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TIENDE A DISMINUIR Y PERMANECE A NIVELES ESTABLES EN LAS RATAS ADULTAS.

POR EL MÉTODO RADIOMÉTRICO NUESTROS RESULTADOS EN GENERAL CONCUERDAN CON LOS OBTENIDOS EN ESTUDIOS EN LOS CUALES SE EMPLEÓ LA MISMA METODOLOGÍA²³. SIN EMBARGO EN EL PRESENTE TRABAJO, A EDADES TEMPRANAS HASTA LOS 10 DÍAS DE EDAD LOS VALORES OBTENIDOS POR EL MÉTODO RADIOMÉTRICO FUERON CONSIDERABLEMENTE MÁS ALTOS QUE POR EL MÉTODO ENZIMÁTICO. A PARTIR DE 15 DÍAS DE EDAD HASTA LLEGAR A LOS ANIMALES ADULTOS, POR AMBAS METODOLOGÍAS LA ACTIVIDAD DE LA GAD ES SIMILAR (FIGS. 8, 9, 10 Y 11).

ES DE INTERÉS MENCIONAR QUE EN HOMOGENADOS DE CORAZÓN DE RATÓN, HÍGADO Y RINÓN, INCUBADOS CON GLUTAMATO MARCADO EN CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA ACTIVIDAD DE LA GAD, HAY UNA PRODUCCIÓN DE $^{14}\text{CO}_2$ DE 2 A 4 VECES MAYOR QUE LA FORMACIÓN DE GABA²², LO CUAL TIENE CIERTA SIMILITUD CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ÉSTE TRABAJO CON ANIMALES JÓVENES HASTA LOS 10 DÍAS DE EDAD. ESTO SUGIERE QUE EN HOMOGENADOS DE CEREBRO INMADURO DE RATA EL CO_2 ES PRODUCIDO A PARTIR DEL GLUTAMATO POR OTRAS VÍAS METABÓLICAS, COMO PODRÍA SER LA CONVERSIÓN DE GLUTAMATO A INTERMEDIARIOS DEL CICLO DE KREBS, LO CUAL SE HA DEMOSTRADO EN EL RINÓN²³. EN LOS ANIMALES DE 2, 5, Y 10 DÍAS DE EDAD, LOS

RESULTADOS OBTENIDOS POR EL MÉTODO RADIOMÉTRICO SE PUEDEN EXPLICAR POR EL HECHO DE QUE EN RATAS RECIÉN NACIDAS ES NORMAL LA UTILIZACIÓN DE CUERPOS CETÓNICOS POR EL CEREBRO, PUES EXPERIMENTAN SITUACIONES DE CETOCIS DADO EL ALTO CONTENIDO GRASO DE LA LECHE MATERNA⁴⁶, ESTO INDICA QUE EL CICLO DE KREBS SEA TAL VEZ MAS ACTIVO EN ANIMALES RECIÉN NACIDOS.

DADO LO ANTERIOR PODEMOS DECIR QUE EL MÉTODO RADIOMÉTRICO NO ES CONFIABLE PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN HOMOGENADOS CEREBRALES DE RATAS A EDADES TEMPRANAS. POR TAL MOTIVO LA DISCUSIÓN SE BASA EN LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL MÉTODO ENZIMÁTICO.

CONVULSIONES Y ACTIVIDAD DE LA GAD EN EL DESARROLLO POSTNATAL.- EL SISTEMA NERVIOSO A EDADES TEMPRANAS SE ENCUENTRA AÚN INMATURO FUNCIONALMENTE, ALCANZANDO LA MADUREZ ENTRE LA SEGUNDA Y LA TERCERA SEMANA DE VIDA EN LA RATA⁴⁷. EN EL RATÓN SE SABE QUE EL CEREBRO TARDA EN MADURAR ENTRE 11 Y 17 DÍAS⁴⁷.

VARIOS ESTUDIOS SOBRE CONTROL DE LA EXCITABILIDAD MOTORA DURANTE EL DESARROLLO HAN MOSTRADO QUE LA SUSCEPTIBILIDAD A LAS CONVULSIONES EN ANIMALES INMADUROS ES DIFERENTE CON RESPECTO A LOS ANIMALES ADULTOS. LOS PATRONES CONVULSIVOS, COMO EL VALOR UMBRAL Y EL TIEMPO NECESARIO PARA INDUCIR CONVULSIONES POR ELECTROSHOCK Y ALGUNOS AGENTES CONVULSIVANTES, VARIAN DURANTE EL DESARROLLO, SUGIRIENDO CAMBIOS DE MADURACIÓN EN LOS MECANISMOS CONCERNIENTES AL CONTROL DE EXCITABILIDAD CEREBRAL. POR EJEMPLO, LAS CONVULSIONES INDUCIDAS CON EL PENTILENTETRAZOL (PTZ) APARECEN EN PERÍODOS CORTOS, APARENTEMENTE POR UN MECANISMO EN EL CUAL NO INVOLUCRA AL SISTEMA SISTEMA GABAÉRGICO, NI AL METABOLISMO DEL

PLP, PUESTO QUE NI LA CONCENTRACIÓN DE PLP NI LA ACTIVIDAD DE LA GAD FUERON MODIFICADAS POR ESTE COMPUESTO⁴⁵. POR LO TANTO ES POSIBLE ESPECULAR QUE LA AUSENCIA DE CONVULSIONES TÓNICO GENERALIZADAS, CON EXTENSIÓN DE LAS EXTREMIDADES, EN RATAS DE 2 Y 5 DÍAS DE EDAD EN EL PRESENTE TRABAJO, SE DEBA QUIZA A LA INMADUREZ CEREBRAL, YA QUE CIERTAS VÍAS NEURONALES NO SE ENCUENTRAN TOTALMENTE MIELINIZADAS Y POR LO TANTO LA COORDINACIÓN MOTORA NO ESTÁ COMPLETAMENTE ESTABLECIDA⁴⁶. A PARTIR DE LOS 10 DÍAS, EL SISTEMA NERVIOSO PARECE HABER ALCANZADO MADUREZ SUFICIENTE PARA MANIFESTAR LA CONVULSIÓN TÓNICO GENERALIZADA. SIN EMBARGO A PARTIR DE LOS 25 DÍAS DE EDAD ESA MADUREZ SE REFLEJA MÁS EN LA MENOR SENSIBILIDAD DE LA GAD A LA INHIBICIÓN POR LA PLPGH, Y POR LO CONSIGUIENTE SÓLO ALGUNOS ANIMALES DE ESA EDAD TIENEN CONVULSIONES Y ÉSTAS YA NO OCURREN POSTERIORMENTE.

LAS CONVULSIONES POR DROGAS EN EDADES TEMPRANAS SE HAN RELACIONADO CON UNA MAYOR PERMEABILIDAD DE LOS CAPILARES CEREBRALES A DICHAS DROGAS. SE HA PROPUESTO QUE LA PERMEABILIDAD DE LOS CAPILARES PODRÍA DIFERIR EN REGIONES CEREBRALES INVOLUCRADAS CON EL FENÓMENO DE LAS CONVULSIONES ENTRE LOS ANIMALES EN DESARROLLO Y LOS ANIMALES ADULTOS⁴⁶, DEPENDIENDO DE SU MADURACIÓN PROGRESIVA. SIN EMBARGO EN UN ESTUDIO HISTOLÓGICO SE ENCONTRÓ QUE A PARTIR DE LA TERCERA SEMANA EL PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE LOS VASOS CAPILARES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA ES APARENTEMENTE EL MISMO QUE EL QUE SE ENCUENTRA EN LOS ANIMALES ADULTOS⁴⁶. EN EL PRESENTE TRABAJO SE PUEDE ESPECULAR QUE TAL VEZ LOS VASOS CAPILARES EN EL CEREBRO DE LOS ANIMALES DE 2 A 15 DÍAS SEAN MÁS PERMEABLES A LA PLPGH,

DISMINUYENDO LA ACTIVIDAD DE LA GAD DE MANERA NOTABLE A ESTAS EDADES QUE EN LOS ADULTOS.

EN UN ESTUDIO²⁷ EN EL CUAL SE RESTRINGIÓ DE B₆ DURANTE LA GESTACIÓN Y LACTACIÓN A RATAS, SE PRESENTARON CRISIS CONVULSIVAS ESPONTÁNEAS EN LAS CAMADAS ENTRE LAS EDADES DE 12 A 18 DÍAS POSTNATALES, DESAPARECIENDO EN ANIMALES DE 28 DÍAS Y DE MAYOR EDAD. LOS NIVELES DE GABA CEREBRAL SE ENCONTRARON DISMINUIDOS EN LOS ANIMALES DE 12 A 28 DÍAS, NORMALIZÁNDOSE A PARTIR DE LOS 56 DÍAS LOS NIVELES DE ESTE NEUROTRANSMISOR AÚN EN RESTRICCIÓN DE B₆. AL DETERMINAR LAS CONCENTRACIONES DE OTROS AMINOÁCIDOS, SE ENCONTRÓ QUE EL GLUTÁMICO Y LA TAURINA DISMINUYERON SIGNIFICATIVAMENTE EN PARALELO CON EL GABA, Y QUE LA GLICINA AUMENTÓ EN RATAS DE 14 DÍAS, COMPARADAS CON ANIMALES CONTROLES, LO CUAL SUGIERE QUE EL GABA NO ES EL ÚNICO TRANSMISOR QUE SE ALTERA CUANDO OCURREN LAS CONVULSIONES POR DEFICIENCIA DE B₆. POR OTRO LADO LA POSIBLE EXPLICACIÓN DE QUE EN LOS ANIMALES ADULTOS NO SE PRESENTEN LAS CONVULSIONES ES QUE LA CONCENTRACIÓN DE B₆ EN EL CEREBRO ADULTO SEA LO SUFICIENTEMENTE ALTA PARA MANTENER LA ACTIVIDAD ADECUADA DE LA HOLOENZIMA DE LA GAD, Y NORMALICE LOS NIVELES DE GABA.

PARA EXPLICAR LOS RESULTADOS DEL PRESENTE TRABAJO, SE PUEDE POSTULAR QUE LA INHIBICIÓN DE LA GAD EN LOS ANIMALES MAYORES DE 25 DÍAS NO ES SUFICIENTE PARA DISMINUIR LA FUNCIÓN SINÁPTICA DEL GABA. OTRA POSIBLE EXPLICACIÓN ES QUE SE ALTERE EL METABOLISMO DE OTROS COMPUESTOS COMO LA 3-HIDROXIKINURENINA (3HK), YA QUE EN UN ESTUDIO RECIENTE SE MUESTRA QUE LOS NIVELES DE (3HK), UN METABOLITO ENDÓGENO DEL TRIPTOFANO EN LA VÍA DE LA KINURENINA, SE

ELEVA EN EL CEREBRO DE ANIMALES NEONATALES DEFICIENTES DE B₆, PERO NO EN ANIMALES ADULTOS²⁶. ESTA POSIBILIDAD SE APOYA TAMBIÉN EN EL HALLAZGO DE QUE AL INYECTAR 3HK EN VENTRÍCULO CEREBRAL DE ROEDORES SE PRODUZCA CONVULSIONES²⁶. EL MECANISMO EXACTO POR EL CUAL LA 3HK PRODUCE CONVULSIONES NO SE CONOCE, PERO EXISTEN ALGUNOS ESTUDIOS QUE MUESTRAN QUE POSIBLEMENTE TENDRÍA UN EFECTO MODULADOR EN EL COMPLEJO DEL RECEPTOR GABA/BENZODIAZEPINAS.

LA INHIBICIÓN DE LA GAD PRODUCIDA POR LA PLPGH EL PRESENTE TRABAJO ES MAYOR EN LOS ANIMALES JÓVENES QUE EN LOS ADULTOS. ESTA MAYOR SICEPTIBILIDAD ES SIMILAR A LA OBSERVADA PREVIAMENTE CON VARIOS TRATAMIENTOS DE LA ENZIMA "IN VITRO", COMO HIPOTONICIDAD, TRITÓN X-100, CENTRIFUGACIÓN Y PREINCUBACIÓN A 37⁰²⁶. SIN EMBARGO, LA ACTIVACIÓN DE LA GAD POR EL PLP FUE ES MAYOR EN LOS ANIMALES JÓVENES, CONTRARIAMENTE A LO REPORTADO²⁷ ESTO INDICA QUE LA GAD DE LOS ANIMALES JÓVENES TIENE MAYOR DEPENDENCIA DEL PLP QUE SE ENCUENTRA LIBRE EN EL CITOPLASMA, O QUE REALMENTE EXISTEN DOS FORMAS DIFERENTES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GAD²⁸ ²⁹, Y LA QUE PREDOMINE EN LOS ANIMALES JÓVENES ES LA QUE SE ENCUENTRE SOLUBLE EN EL CITOPLASMA, MAS DEPENDIENTE DEL COFACTOR LIBRE.

VII. CONCLUSIONES.

- 1.- EL MÉTODO ENZIMÁTICO ES MÁS CONFIABLE PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO.
- 2.- EN TODAS LAS EDADES ENSAYADAS, LA ACTIVIDAD DE LA GAD DISMINUYE EN LAS RATAS TRATADAS CON PLPGH EN AUSENCIA DE PLP.
- 3.- EN TODAS LAS EDADES LA GAD FUE DEPENDIENTE DE PLP.
- 4.- EL PLP REVIERTE LOS EFECTOS DE LA PLPGH.
- 5.- LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN RATAS RECIEN NACIDAS ES MÁS SUSCEPTIBLE A LA PLPGH QUE EN LAS RATAS ADULTAS.
- 6.- LAS RATAS ADULTAS NO SUFREN CONVULSIONES CON PLPGH.
- 7.- NO HAY UNA CLARA RELACIÓN ENTRE LA INHIBICIÓN DE LA GAD Y LA APARICIÓN DE CONVULSIONES EN LA RATA.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS

- 1.- ECCLES, J. (1982) THE SYNAPSE: FROM ELECTRICAL TO CHEMICAL TRANSMISSION. ANN. REV. NEUROSC. 5:325-339.
- 2.- SCHWARTZ, H.J. (1985) CHEMICAL MESSENGERS: SMALL MOLECULES AND PEPTIDES. EN: PRINCIPLES OF NEURONAL SCIENCE. 148-158 PP. KANDEL, E, R Y SCHWARTZ, J, H. (EDS.). ELSEVIER, NEW YORK.
- 3.- TAPIA, R. (1983) EL ACIDO T-AMINOBUTÍRICO. EN: AMINOÁCIDOS Y PEPTIDOS EN LA INTEGRACIÓN DE FUNCIONES NERVIOSAS. (EDS. PASANTES MORALES, H. Y ARECHIGA, H.). BIBLIOTECA DE CIENCIAS. UNAM.
- 4.- MILEDI, R. (1973) TRANSMITTER RELEASE INDUCED BY INYECTION OF CALCIUM IONS INTO NERVE TERMINALS. PROC. R. SOC. LOND. B. 183: 421-425.
- 5.- RUBIN, R. P. (1982) CALCIUM AND CELULAR SECRETION. PLENUM PRESS. NEW YORK. 276 PP.
- 6.- ROBERTS, E., Y FRANKEL, S. (1950) GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID IN BRAIN: ITS FORMATION FROM GLUTAMIC ACID. J. BIOL. CHEM. 187: 35-39.
- 7.- AWAPARA, J., LANDUA, A. J., FUERST, R Y SEALE, B. (1950) FREE GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID IN BRAIN. J. BIOL. CHEM. 187:35-39.
- 8.- FLOREY, E. (1961) COMPARATIVE PHYSIOLOGY: TRANSMITTER SUBSTANCE. ANN. REV. PHYSIOL. 12:501-528.
- 9.- BAZEMORE, A.W., ELLIOT, K.A., Y FLOREY, E. (1957) ISOLATION OF FACTOR I. J. NEUROCHEM. 1:334-339.
- 10.- OBATA, K., Y TAKEDA, K. (1969) RELEASE OF GABA INTO

- THE FOURTH VENTRICLE INDUCED BY STIMULATION OF THE CAT CEREBELLUM. J. NEUROCHEM. 16:1043-1047.
- 11.- KRNJEVIC, K., Y S CHWARTZ. (1967) THE ACTION OF T-AMINO BUTYRIC ACID ON CORTICAL NEURONES. EXP. BRAIN RES. 3:320-336.
 - 12.- SCHWARTZ, R. D. (1980) THE GABA_A RECEPTOR-GATED ION CHANNEL: BIOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDIES OF STRUCTURE AND FUNTION. BIOCHEM. PHARMACOL. 18:3369-3375.
 - 13.- BORMAN, J. (1988) ELECTROPHYSIOLOGY OF GABA_A AND GABA_B RECEPTOR SUBTYPES. IINS. 3:112-116.
 - 14.- IVERSEN, L. L., MITCHEL, J. F. Y SRINIVASAN, V. (1971) THE RELEASE OF T-AMINO BUTYRIC ACID DURING INHIBITION IN THE CAT VISUAL CORTEX. J. PHYSIOL. 212:519-534.
 - 15.- MARTINEZ HERNANDEZ, A., BELL, K. P. Y NOREMBERG, M. D. (1977) GLUTAMINE SINTETASE: GLIAL LOCALIZATION IN BRAIN. SCIENCE. 195:1353-1358.
 - 16.- BENJAMIN, A. M. Y QUASTEL, J. H. (1972). LOCATIONS OF AMINO ACIDS IN BRAIN SLICES FROM THE RAT. TETRODOTOXIN-SENSITIVE RELEASE OF AMINO ACIDS. BIOCHEM. J. 128:631-646.
 - 17.- BRADFORD, H. E., DE BELLEROHE, J. S. Y WARD, H. K. (1978) ON THE MATABOLIC AND INTRASYNAPTIC ORIGIN OF AMINO ACID TRANSMITTERS. EN: AMINO ACIDS AS CHEMICAL TRANSMITTERS. (F. FONNUM, ED.), PLENUM PRESS, NEW YORK. 367-377 PP.
 - 18.- SMITH, C. U. M. (1989) ELEMENTS DE MOLECULAR NEUROBIOLOGY. JONH WILEY AND SONS. NEW YORK. 525 PP.

- 19.- WU J, Y., MATSUDA T., Y ROBERTS, E., (1973)
PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUTAMATE
DECARBOXYLASE FROM MOUSE BRAIN. J. BIOL. CHEM.
248:3029-3034.
- 20.- BLIDERMAN, J. M., MAITRE, M., OSSOLA, L., Y MANDEL.
P. (1978) PURIFICATION AND SOME PROPIERTES OF L-
GLUTAMATE DECARBOXYLASE FROM HUMAN BRAIN. EUR. J.
BIOCHEM. 86: 143-152.
- 21.- MAITRE, M., BLIDERMAN, J. M., OSSOLA, L., Y MANDEL,
P. (1978) COMPARISON OF THE STRUCTURES OF L-GLUTAMATE
DECARBOXYLASES FROM HUMAN AND RAT BRAINS. BIOCHEM.
BIOPHYS. RES. COMMUN. 85:885-890.
- 22.- WU, J. Y., WONG, E., SAITO K., ROBERTS , E., Y SCHOUSBOE
SHOUSBOE A. (1976) PROPERTIES OF L-GLUTAMATE
DECARBOXYLASE FROM BRAINS OF ADULT AND NEWBORN MICE.
J. NEUROCHEM. 653-659.
- 23.- TAPIA, R., Y SANDOVAL, M. E. (1971) STUDY ON THE
INHIBITION OF BRAIN GLUTAMATE DECARBOXYLASE BY
PYRIDOXAL PHOSPHATE OXIME-O-ACETIC ACID. J. NEUROCHEM.
18:2051-2059.
- 24.- BAYÓN, A., POSSANI, C. D., Y TAPIA, R. (1977) KINETICS
OF BRAIN GLUTAMATE DECARBOXYLASE. INHIBITION STUDIES
WITH N-(5'-PHOSPHOPYRIDOXYL) AMINO ACIDS. J. NEUROCHEM.
29:513-517.
- 25.- TAPIA, R., Y COVARRUBIAS, M. (1978) GLUTAMATE
DECARBOXYLASE, PROPERTIES AND THE SYNAPTIC FUNTION OF
GABA. EN: AMINO ACIDS AS CHEMICAL TRANSMITTERS. F.
FONUM (ED.) PLENUM PRESS, NEW YORK, PP. 431-438.

- 26.- COVARRUBIAS M., Y TAPIA, R. (1978) CALCIUM-DEPENDENT BINDING OF BRAIN GLUTAMATE DECARBOXYLASE TO PHOSPHOLIPID VESICLES. J. NEUROCHEM. 31:1209-1214.
- 27.- SHANK, R.P., Y APRISON, M. H. (1977) GLUTAMINE UPTAKE AND METABOLISM BY THE ISOLATED TOAD BRAIN: EVIDENCE PERTAINING TO ITS PROPOSED ROLE AS A TRANSMITTER PRECURSOR. J. NEUROCHEM. 28:1189-1196.
- 28.- TAPIA, R., Y GONZÁLEZ, R. M. (1978) GLUTAMINE AND GLUTAMATE AS PRECURSORS OF THE RELEASABLE POOL OF GABA IN BRAIN CORTEX SLICES. NEUROSCI. LETT. 10:171-174.
- 29.- TAPIA, R. (1974) THE ROLE OF T-AMINOBUTIRIC ACID METABOLISM IN THE REGULATION OF CEREBRAL EXCITABILITY, EN: NEUROHUMORAL CODING OF BRAIN FUNCTION. MYERS R. D. Y DRUCKER-COLIN R. R. (EDS.). PLENUM PRESS, N.Y., PP. 3-26.
- 30.- WU, J. Y. (1976) PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND KINETIC STUDIES OF GAD AND GABA-T FROM MOUSE BRAIN, EN: GABA IN NERVOUS SYSTEM FUNCTION. E. ROBERTS, T. N. CHASE, Y D. B. TOWER (EDS.). RAVEN PRESS, NEW YORK., PP.7-55.
- 31.- MCGEER, P. L., ECCLES, J. C., MCGEER, E. G. (1978) MOLECULAR NEUROBIOLOGY OF THE MAMMALIAN BRAIN. PLENUM PRESS, NEW YORK, PP. 199-254.
- 32.- MCLAUGHLIN, B., BARBER, R., SAITO, K., ROBERTS, E., Y WU, J.Y (1975) IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF GLUTAMATE DACARBOXYLASE IN RATS SPINAL CORD. J. COMP. NEUROL. 164:305-322.
- 33.- RIBAK, C. E., VAUGHN, J. E., BARBER, R. P. (1981)

- IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF GABAERGIC NEURONS AT THE ELECTRON MICROSCOPICAL LEVEL. J. HISTOCHEM. 13:555-582.
- 34.- WOOD, J. H., HARE, T., ENNNA, S. J., Y BALA MANYAM, N. V. (1980) SITES OF ORIGIN AND ROSTROCAUDAL CONCENTRATION GRADIENTS OF GABA IN CEREBROSPINAL FLUID. BRAIN. RES. BULL. 5:111-114.
- 35.- SIMS, L. K. Y PITTS, F. N. (1970) BRAIN GLUTAMATE DECARBOXYLASE: CHANGES IN THE DEVELOPING RAT BRAIN. J. NEUROCHEM. 17:1607-1612.
- 36.- TAPIA, R., Y MEZA-RUIZ, G. (1975) DIFERENCES IN SOME PROPERTIES OF NEWBORN AND ADULT BRAIN GLUTAMATE DECARBOXYLASE. J. NEUROBIOL. 6:171-181.
- 37.- TAPIA, R., Y MEZA-RUIZ, G. (1976) CHANGES IN SOME PROPERTIES OF GLUTAMATE DECARBOXYLASE ACTIVITY DURING THE MATURATION OF THE BRAIN. NEUROCHEM. RES. 1:133-140
- 38.- SAITO, K., SCHOUSBOE, A., WU, J. Y., ROBERTS, E. (1974) SOME IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES AND SPECIES SPECIFICITY OF GABA-ALFA-KETOGLUTARATE TRANSAMINASE FROM MOUSE BRAIN. BRAIN. RES. 65:287-296.
- 39.- ALBERS, R. W Y BRADY, R. D. (1959) THE DISTRIBUTION OF GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE IN THE NERVOUS SYSTEM OF THE RHESUS MONKEY. J. BIOL. CHEM. 234:926-928.
- 40.- JAKOBY, W. B. (1962) T-AMINOBUTYRATE AND α -KETOGLUTARATE ASSAY. EN: METHODS IN ENZIMOLOGY. VOL. 5 EDS. COLOWICK, S. P. KAPLAN, N. O. (EDS.). ACADEMIC PRESS, NEW YORK. PP. 777-778.
- 41.- SCHOUSBOE, A., WU, J. Y., ROBERTS, E. (1973)

- PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE 4-AMINOBUTYRATE-2-KETOGLUTARATE TRANSAMINASE FROM MOUSE BRAIN. BIOCHEMISTRY. 12:2868-2873.
- 42.- SHANK, R. P., Y APRISON, M. H. (1971) POST-MORTEN CHANGES IN THE CONTENT AND SPECIFIC RADIOACTIVITY OF SEVERAL AMINO ACIDS IN FOUR AREAS OF THE RAT BRAIN. J. NEUROBIOL. 2:145-151.
- 43.- MILLER, L. P., WALTERS, J. R., MARTIN, D. L. (1977) POST-MORTEM CHANGES IMPLICATE ADENINE NUCLEOTIDES AND PYRIDOXAL-5'-PHOSPHATE IN REGULATION OF BRAIN GLUTAMATE DECARBOXYLASE. NATURE. 266:847-848.
- 44.- IADAROLA, M. J., Y GALE, K. (1981) CELLULAR COMPARTMENTS OF GABA IN BRAIN AND THEIR RELATIONSHIP TO ANTICONVULSANT ACTIVITY. MOL. CELL. BIOCHEM. 39:305-330.
- 45.- CASH, ET AL. (1979) BRAIN SUCCINIC SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE. EN: ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY. GABA-BIOCHEMISTRY AND CNS FUNCTION. MANDEL Y DEFREUDIS (EDS.). PLENUM PRESS, NEW YORK. PP.93-111.
- 46.- VAN DER BERG, C. J., VAN KEMPEN, G. M. J., SCHADE, J. P., Y VELOSTRA, H. (1965) LEVELS AND INTRACELLULAR LOCALIZATION OF GLUTAMATE DECARBOXYLASE AND T-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE AND OTHER ENZYMES DURING THE DEVELOPMENT OF THE BRAIN. J. NEUROCHEM. 12:863-869.
- 47.- BLOCH-TARDY, M., ROLLAND, B., Y GONNARD, P. (1971) ONTOGENETIC EVOLUTION OF THE MOLECULAR FORMS OF 4-AMINOBUTYRATE AMINOTRANSFERASE IN RAT BRAIN AND LIVER.

- J. NEUROCHEM. 18:1779-1781.
- 48.- HERRERA, E. (1986) BIOQUIMICA. CAPS 7 Y 48. ED. INTERAMERICANA, MÉXICO. D. F.
- 49.- COURSIN, B. D. (1969) VITAMIN B₆ AND BRAIN FUNCTION IN ANIMALS AND. ANN N. Y. ACAD. SCI. 166:7-14.
- 50.- BONILLA, R. E. (1985) BASES MOLECULARES DE LA NEUROTRANSMISION. EDICIONES ASTRO DATA, MARACAIBO VENEZUELA. PP. 341-402.
- 51.- TOWER, D. B. (1976) GABA AND SEIZURES: CLINICAL CORRELATES IN MAN. GABA IN NERVOUS SYSTEM FUNCTION. E. ROBERTS; T. N. CHESE Y D. B. TOWER (EDS). RAVEN PRESS, NEW YORK.
- 52.- HORTON, R. W., Y MELDRUM, B. S. (1973). SEIZURES INDUCED BY ALLYLGLYCINE, 3-MERCAPTOPROPIONIC ACID AND 4-DEOXYPIRIDOXINE IN MICE AND PHOTOSENSITIVE BABOON, AND DIFERENT MODES OF THE INHIBITION OF CEREBRAL GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE. BR. J. PHARMACOL. 49:52-63.
- 53.- NITSCH, C. (1980) REGULATION OF GABA METABOLISM IN DISCRETE RABBIT BRAIN REGIONS UNDER METHOXYPIRIDOXINE. J. NEUROCHEM. 34:822-830.
- 54.- MELDRUM, B. S., HORTON, R. W., Y SAWAYA, M. C. B. (1975) THE CONVULSANT ACTION OF METHYLDITHIOCARBAZINATE: A COMPARISON WITH OTHER SULPHUR-CONTAINING HYDRAZIDES. J. NEUROCHEM. 24:1003-1009.
- 55.- LOSCHER, W. (1979) 3-MERCAPTOPROPIONIC ACID: CONVULSANT PROPERTIES, EFFECTS OF ENZYMES OF THE T-AMINO BUTYRATE SYSTEM IN MOUSE BRAIN AND ANTAGONISM BY CERTAIN ANTICONVULSANT DRUGS, AMINO OXYACETIC ACID AND

- GABACULINE. BIOCHEM. PHARMACOL. 28:1397-1407.
- 56.- TAPIA, R. Y AWAPARA, J. (1967) FORMATION OF T-AMINOBUTYRIC ACID GABA IN BRAIN OF MICE TREATED WITH L-GLUTAMIC ACID-T-HYDRAZIDE AND PYRIDOXAL PHOSPHATE-T-GLUTAMYL HYDRAZONE. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 126. 218.
- 57.- TAPIA, R., PÉREZ DE LA MORA, M. Y MASSIEU, H. G. (1967) MODIFICATIONS OF BRAIN GLUTAMATE DECARBOXYLASE ACTIVITY BY PYRIDOXAL PHOSPHATE-T-GLUTAMYL HYDRAZONE. BIOCHEM. PHARMACOL. 16:1211-1218.
- 58.- TAPIA, R., PASANTES-MORALES, H., TABORDA E., Y PÉREZ DE LA MORA, M. (1975) SEIZURE SUSCEPTIBILITY IN THE DEVELOPING MOUSE AND ITS RELATIONSHIP TO GLUTAMATE DECARBOXYLASE AND PYRIDOXAL PHOSPHATE IN BRAIN. J. NEUROBIOL. 164:159-170.
- 59.- TAPIA, R. (1975) BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY OF GABA IN CNS. EN: HANDBOOK OF PSYCHOPHARMACOLOGY, VOL. 4. IVERSEN, L. L., IVERSEN, S. D. Y SNYDER, S. H. (EDS.). PLENUM PRESS, NEW YORK, PP.1-58
- 60.- DIAZ-MUNOZ, M. Y TAPIA, R. (1988) GLUTAMATE DECARBOXYLASE INHIBITION AND VITAMIN B₆ METABOLISM IN BRAIN OF CIRRHOTIC RATS CHRONICALLY TREATED WITH CARBON TETRACHLORIDE. J. NEUROSCI. RES. 20:376-382.
- 61.- LOWRY, O. ROSEBROUGH, N. FARR, A, RANDALL, R. J. (1951) PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. J. BIOL. CHEM. 193:265-275.
- 62.- BAYOUMI, R. A. Y SMITH, W. R. D. (1972) SOME EFFECTS OF

- DIETARY VITAMIN B₆ DEFICIENCY ON T-AMINO BUTIRIC ACID METABOLISM IN DEVELOPING RAT BRAIN. J. NEUROCHEM. 19: 1883-1897.
- 63.- WU, J. Y. ET AL. (1978) DISTRIBUTION AND TISSUE SPECIFICITY OF GLUTAMATE DECARBOXYLASE (EC. 4.1.1.15). J. NEUROCHEM. 30:849-857.
- 64.- MCILWAIN, H. Y BACHELARD, S. H. (1985) BIOCHEMISTRY AND THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. CHURCHILL LIVINGSTONE, NEW YORK, 660 PP.
- 65.- ZIYA, Z. Z. Y ATEs, N. (1989) AGE-RELATED CHANGES IN REGIONAL PATTERNS OF BLOOD-BRAIN BARRIER BREAKDOWN DURING EPILEPTIFORM SEIZURES INDUCED BY PENTYLENTETRAZOL. NEUROSCI. LETTERS. 96:174-184.
- 66.- CONFORD, E. M. Y OLDENFORD, W. H. (1986) EPILEPSY AND BLOOD-BRAIN BARRIER. EN: ADVANCES IN NEUROLOGY. VOL. 44. A. V. DELGADO, ESCUETA, A, A. WARD JR. D. M. WOODBURY AND R. J. PORTER (EDS). RAVEN, NEW YORK, PP. 787-812.
- 67.- GUILARTE, T. R. (1989) REGIONAL CHANGES IN THE CONCENTRATIONS OF GLUTAMATE, GLYCINE, TAURINE, AND GABA IN THE VITAMIN B₆ DEFICIENT DEVELOPING RAT BRAIN: ASSOCIATION WITH NEONATAL SEIZURES. NEUROCHEM. RES. 14:889-897.
- 68.- GUILARTE, T. R. Y WAGNER, H. N. (1981) INCREASED CONCENTRATIONS OF 3-HYDROXYKYNURENINE IN VITAMIN B₆ DEFICIENT NEONATAL RAT BRAIN. J. NEUROCHEM. 49:1819-1926.
- 69.- LAPIN, I. (1981) KYNURENINES AND SEIZURES. EPILEPSIA. 22:257-265.

70.- TAPIA, R. (1976) BASES BIOQUÍMICAS DE LA TRANSMISIÓN
SINÁPTICA; NEUROTRANSMISORES. BOL. EST. MED. BIOL.
29:149-155.