

03062
14
2eje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

REGULACION POR PRODUCTO DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA
CEREBRAL *IN VIVO* Y SU RELACION CON LOS MECANISMOS
EPILEPTOGENICOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
(Area neurociencias)

PRESENTA:

Norma Patricia Salazar Sandoval

Ciudad Universitaria, México, D.F. 1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO

Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia

Dra. Alicia González Manjarrez

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Dra. Herminia Pasantes Morales

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Este trabajo se desarrolló en el Instituto de Fisiología Celular bajo la dirección del Dr. Ricardo Tapia a quien agradezco profundamente su interés y apoyo. Igualmente agradezco la colaboración del Dr. Simón Brailowsky.

Este trabajo lo dedico a:

Norma y Javier por ser unos padres maravillosos.
David, Edgar e Ileana por ser los mejores hermanos.
Laura, Maritza y José por ser mis cuñados favoritos.
Jorge, Diego y Rodrigo por ser mis sobrinos preferidos.
Iván por su gran cariño, ayuda y comprensión.
Lourdes, Clorinda, Eva, Gloria, Isabel, Alberto,
Francisco, Teresa, Sergio, Oscar, Eduardo, Laura,
José Luis, Jorge, Diana, Julio, Mauricio, Alma,
Gabriela, Esperanza, Lenin, Luis, Miguel, Victor,
Polo y Pita, por ser mis mejores amigos.
Gorky y Piwi sin palabras.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
ADP	Adenosina difosfato
Ala	Alanina
AOAA	Acido aminooxiacético
ApoGAD	GAD ₆₅ pegada a la membrana citoplasmática
ASP	Acido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
Bb	Barbitúrico
Bz	Benzodiazepina
CCM	Corteza motora contralateral al sitio infundido
CCO	Corteza occipital contralateral al sitio infundido
CM	Corteza motora infundida
CO	Corteza occipital ipsilateral al sitio infundido
DNA	Acido desoxirribonucléico
EEG	Electroencefalograma
EGTA	Acido etilenglicol-bis-(β-aminoetil eter) N,N,N',N' tetracético
EOS	Sulfato de etanolamina
GABA	Acido γ-aminobutírico
GABA _A	Receptor de GABA tipo A
GABA _B	Receptor de GABA tipo B
GABA-T	γ-aminobutirato-2-oxoglutarato amino transferasa (GABA transaminasa)
GAD	L-glutamato-1-carboxi-liasa (descarboxilasa del glutamato)

GDP	Guanosina difosfato
GLN	Glutamina
GLNASA	Glutaminasa
GLU	Acido glutámico
GLY	Glicina
GS	Glutamino sintetasa
GTP	Guanosina trifosfato
GVG	Acido 4-amino-hexa-5-enóico ó γ -vinil GABA
HoloGAD	GAD ₆₇ soluble
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
KG	α -cetoglutarato
MK	Medio Krebs, medio fisiológico
NMDA	N-metil-D-aspartato
OPA	o-ftaldialdehído
PAL	Piridoxal
Pi	Fosfato inorgánico
PK	Proteína cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLP	Fosfato de piridoxal
PMA	Piridoxamina-5'P
PXA	Piridoxina
RNA	Acido ribonucléico
RNA _m	Acido ribonucléico mensajero
SAG	Síndrome de abstinencia al GABA
SAS	Semialdehído succínico
SNC	Sistema Nervioso Central

TAU Taurina
TBPS t-butilbicciclofosforotionato
THIP 4,5,6,7-tetrahidroisoxasol-piridinol

INDICE

ORGANIZACION DE LA TESIS	pag
I. INTRODUCCION.....	1
1. TRANSMISION SINAPTICA.....	2
2. METABOLISMO DEL GABA.....	4
2.1 GAD.....	5
a) ApoGAD.....	6
b) HoloGAD.....	10
c) Mecanismos de regulaci3n de la GAD.....	12
2.2 GABA-T.....	19
3. Receptores.....	20
4. EL GABA Y LA EPILEPSIA.....	23
a) P3rdida neuronal.....	24
b) Bloqueo de receptores.....	24
c) Inhibici3n de la GAD.....	25
d) S3ndrome de abstinencia al GABA.....	32
II. OBJETIVOS.....	36
III. METODOS EXPERIMENTALES.....	38
IV. TRABAJO PUBLICADO: Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of γ-aminobutyric acid.....	45
V. RESULTADOS ADICIONALES Y FIGURAS NO INCLUIDAS EN LA PUBLICACION.....	46
VI. DISCUSION GENERAL DEL TRABAJO.....	69
VII. CONCLUSIONES.....	80
VIII. REFERENCIAS.....	81

ORGANIZACION DE LA TESIS

La tesis consta de 7 partes: la primera es una introducción general que describe los antecedentes del tema en estudio, y que abarca la transmisión GABAérgica y su relación con la epilepsia; la segunda menciona los objetivos del presente trabajo; la tercera desarrolla los métodos experimentales utilizados para cubrir los objetivos; la cuarta anexa el artículo que se publicó con algunos de los resultados obtenidos; la quinta se refiere a los resultados adicionales que no se incluyeron en la publicación; la sexta es una discusión general de todos los resultados obtenidos; y la última parte son las conclusiones del trabajo.

I. INTRODUCCION

La epilepsia es una enfermedad neurológica caracterizada por crisis recurrentes, generalmente breves, debidas a descargas excesivas de las neuronas cerebrales. Usualmente se relaciona con síntomas motores y sensoriales, que pueden acompañarse con trastornos en la conciencia. Las crisis pueden asociarse con diversos factores que resultan de diferentes condiciones patológicas como son: genéticas (anormalidades congénitas), infecciosas (meningitis, convulsiones febriles), tóxicas (drogas y alcohol), alteraciones metabólicas (disminución en vitamina B₆), etc. Datos de la Organización Mundial de la Salud indican que la epilepsia es un problema de salud por su alta incidencia en niños y adultos, siendo aproximadamente del 1% en la población mundial humana (*Rubio-Donnadieu, 1989*).

La electroencefalografía es uno de los métodos fundamentales para el diagnóstico de la epilepsia. Las crisis epilépticas que se registran son el resultado de la descarga anormal y exagerada de algunas neuronas cerebrales, como las células piramidales de la corteza, o del hipocampo, como consecuencia de una despolarización rápida y repetitiva, que se asocia con cambios en el flujo de los iones intracelulares (salida de potasio y acumulación de sodio). Los estudios de la actividad eléctrica de las neuronas han mostrado principalmente dos tipos de crisis, aunque existen múltiples subtipos (*Rubio-Donnadieu, 1989, 1991*):

Parcial: la actividad eléctrica de las neuronas presenta despolarizaciones lentas de gran amplitud y sincrónicas, asociadas con trenes de potenciales de acción de alta frecuencia. Se inicia en uno de los hemisferios cerebrales. Puede o no haber alteración de la conciencia, la cual se determina como la incapacidad de respuesta ante estímulos externos.

Generalizada: Las descargas neuronales son bilaterales, simétricas y sincrónicas. Se presenta en los dos hemisferios cerebrales y puede asociarse con alteraciones motoras.

Hasta la fecha, a pesar de los adelantos en el conocimiento de este mal, no todos los tratamientos son adecuados, y esto, aunado a que existen limitaciones naturales para estudiar la epilepsia humana, ha creado la necesidad de experimentar en modelos animales que semejen la enfermedad. Con estos modelos se estudian los mecanismos neuronales implicados en la generación y el desarrollo de las crisis, así como la aplicación de drogas antiépilépticas que, con base en la neurotransmisión sináptica, pudieran ser efectivas posteriormente en humanos, en lo cual radica la importancia de su estudio (Solís y Arauz., 1989; Rubio-Donnadieu, 1991).

1. TRANSMISION SINAPTICA

En el sistema nervioso central (SNC) hay dos formas de regulación de la excitabilidad neuronal. Las células neuronales se comunican mediante la transmisión de la información a través de sinapsis que pueden ser excitatorias, mediadas principalmente por

el ácido glutámico, o inhibitorias, mediadas principalmente por el ácido γ -aminobutírico (GABA). Estos dos sistemas normalmente se encuentran en equilibrio, por lo cual la estimulación de las vías glutamatérgicas o la disminución en la neurotransmisión GABAérgica, inducen una hiperexcitabilidad neuronal, que es una de las características de la epilepsia (Tapia, 1991).

El glutamato es un neurotransmisor excitador del SNC (Tapia, 1991; López-Colomé, 1983). Se encuentra ampliamente distribuido debido a su participación en múltiples funciones como: la síntesis de proteínas, la regulación de los niveles de amonio, y como precursor de diferentes sustratos del ciclo de Krebs y del GABA. Se sintetiza por transaminación del α KG que es un sustrato del ciclo de Krebs, o mediante una sintetasa a partir de la glutamina, siendo esta última una vía importante de la poza liberable del aminoácido. El glutamato se libera de las células glutamatérgicas al espacio extracelular de manera dependiente de calcio. Tiene un sistema de captura de alta afinidad.

Los efectos excitadores sobre las neuronas están relacionados con una despolarización, la cual se lleva a cabo al pasar cationes a través de los canales asociados a los diferentes tipos de receptores membranales postsinápticos a los aminoácidos excitadores. Se conocen varios tipos de estos receptores, de acuerdo al agonista que los activa: el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), y otros llamados no-NMDA, uno de los cuales es activado por quisqualato y el otro por kainato (Fagg y Massieu, 1991).

Una forma en la que se puede generar la hiperexcitabilidad cerebral, es por un aumento en la actividad de las neuronas glutamatérgicas, lo cual puede resultar en la aparición de convulsiones (Tapia, 1975, 1976, 1991; Chapman, 1991; Fagg y Massieu, 1991). El estudio del efecto de los antagonistas de los aminoácidos excitadores ha mostrado que estos pueden tener una acción anticonvulsiva en diferentes modelos de epilepsia (Chapman, 1991).

Otro mecanismo de regulación de la actividad neuronal cerebral, es el control por inhibición. El neurotransmisor inhibitor más ampliamente distribuido en el SNC de los mamíferos es el GABA (Tapia, 1983a, b; 1991) y las alteraciones en la transmisión sináptica GABAérgica resultan en la aparición de la epilepsia. Por ello, y por ser el tema central del presente trabajo, revisaremos en detalle el metabolismo del GABA.

2. METABOLISMO DEL GABA

El metabolismo de este aminoácido depende principalmente de dos enzimas (Tapia, 1983a, b): la descarboxilasa del ácido glutámico (L-glutamato-1-carboxi-licasa; EC 4.1.1.15; GAD) que es la responsable de su síntesis y utiliza al 5'-fosfato de piridoxal (PLP) como cofactor; y la transaminasa del GABA (4-aminobutirato-2-oxoglutarato amino transferasa; EC 2.6.1.19; GABA-T), que es la encargada de su transformación en ácido glutámico y semialdehído succínico.

2.1. GAD:

Esta enzima utiliza como sustrato al ácido glutámico proveniente de la transaminación del α KG del ciclo de Krebs, o del que se origina por la degradación de la glutamina. La GAD mediante una reacción de descarboxilación del sustrato sintetiza al GABA (Tapia 1983). El estudio de las propiedades de la enzima purificada del cerebro de ratón (Wu y Roberts, 1974), ha demostrado que la GAD es sensible a agentes que actúan sobre los grupos sulfhidrilo de la proteína, como el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y el p-cloromerburibenzoato (PCMB), que inhiben competitivamente la actividad de la enzima. Por otro lado, la actividad de la GAD disminuye al estar en contacto con compuestos que poseen grupos tiol en su estructura, como los ácidos 3-mercaptopropiónico y 2-mercaptopropiónico, los cuales son inhibidores competitivos con una K_i de orden micromolar. De los compuestos capaces de atrapar grupos carbonilo, el que inhibe a la GAD de manera más eficiente es el ácido aminooxiacético, seguido por la hidroxilamina, la hidrazina y la semicarbazida. Algunos ácidos dicarboxílicos como el D-glutamato, el α -cetoglutarato y el fumarato, inhiben competitivamente a la GAD, con una K_i de orden milimolar. La actividad de la enzima no se afecta en presencia de Li^+ , Na^+ , NH_4^+ o Cs^+ (hasta 10 mM de cada uno). Los aniones I^- , Br^- , Cl^- y F^- inhiben a la enzima débilmente. Sin embargo, los cationes divalentes son potentes inhibidores de la GAD, siendo el más eficaz el Zn^{2+} , que con 10 μM inhibe a la enzima aproximadamente un 50%.

Recientemente se han descrito dos tipos de GAD, una en forma de apoenzima y la otra como holoenzima, con características y funciones aparentemente diferentes, que permiten aportar una mayor flexibilidad en los sistemas de regulación de la función sináptica del GABA.

Los dos tipos de GAD fueron postulados mediante estudios de cinética y de inhibición (Tapia y Sandoval, 1971; Bayón y col., 1977a, 1977b, 1978; Covarrubias y Tapia 1980). Recientemente se han identificado y caracterizado a las dos proteínas (Chang y Gotlieb, 1988; Kaufman y col., 1991; Denner y Wu, 1985; Legay y Tappaz, 1987), y secuenciado los genes que codifican a cada una de ellas (Erlander y col., 1991; Erlander y Tobin, 1991; Huang y col., 1990; Bu y col., 1992; Kobayashi y col., 1987; Benson y col., 1991; Julien y col., 1990; Karlsen y col., 1991; Wyborski y col., 1990). Estos trabajos han sido de gran ayuda para conocer las características específicas de cada una de estas proteínas, como son: el tamaño, la distribución, la secuencia, además de la interacción con el PLP, que sugieren un papel fisiológico diferente (Feldblum y col., 1993; Erlander y Tobin, 1991; Tillakaratne y col., 1992; Esclapez y col., 1994).

a) APOGAD

La apoenzima tiene un peso molecular de 65 KDa, por lo que se denomina GAD₆₅ (Erlander y col., 1991; Martin y col., 1991a). Se une mediante interacciones electrostáticas a la membrana de las terminales nerviosas y a liposomas (Tapia y Sandoval 1971;

cofactor para su activación, el PLP (Tapia, 1983; Kaufman y col., 1991; Denner y Wu, 1985). El PLP se encuentra libre en el citoplasma y se sintetiza mediante la cinasa de piridoxal (PK) a partir de piridoxal (PAL), el cual se interconvierte con la piridoxina, o la piridoxamina, ambos componentes de la vitamina B₆. La disponibilidad del PLP se puede regular por la formación de bases de Schiff con aminoácidos como el GABA o el propio ácido glutámico. La concentración de PLP libre es importante para regular a la GAD, al igual que algunos factores metabólicos como la adenosina difosfato (ADP), la adenosina trifosfato (ATP) y el fosfato inorgánico (Pi), como mencionaré más adelante. Se ha postulado que la apoGAD utiliza como sustrato al ácido L-glutámico proveniente de la desamidación de la glutamina sintetizada en las células gliales, y que el GABA formado por esta vía se libera tónicamente al espacio extracelular (Tapia, 1983) (Figura 1).

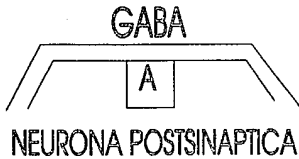
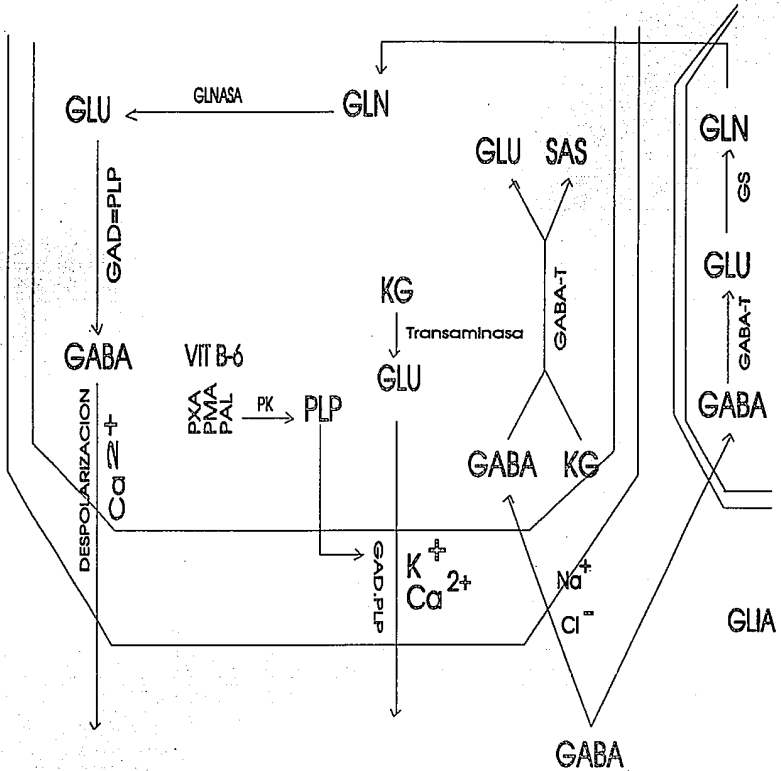
La distribución de la GAD es un parámetro importante para conocer su función. Así, la GAD₆₅ está asociada preferentemente con terminales nerviosas. El RNAm de la apoGAD se encuentra alto durante los períodos de sinaptogénesis en el cerebelo y en el estriado en desarrollo, por lo que se ha sugerido que en estas regiones la enzima juega un papel trófico (Greif y col., 1991, 1992).

Feldblum y col., en 1990, utilizando técnicas de hibridación *in situ* en secciones coronales de cerebro de rata, demostraron que el RNAm de cada una de las dos GADs, presenta aproximadamente la misma distribución cerebral. Las dos están en interneuronas y en

Figura 1. Metabolismo del GABA.

Los principales eventos neuroquímicos del metabolismo del GABA, se presentan en las terminales nerviosas de las células GABAérgicas. El glutamato (glu) proveniente de la transaminación del α KG del ciclo de Krebs o de la degradación de la glutamina (gln) glial, es el principal precursor para la síntesis del GABA, la cual se lleva a cabo mediante una reacción de descarboxilación por la GAD. Esta enzima se encuentra en dos formas, una pegada a la membrana por interacciones electrostáticas (Ca^{2+} y K^+), que sintetiza GABA liberable tónicamente, la cual se regula por la disponibilidad de PLP proveniente de la fosforilación por una proteína cinasa a partir de alguno de los componentes de la vitamina B₆: piridoxina (pxa), piridoxamina (pma), piridoxal (pal); la otra GAD se encuentra libre en el sinaptoplasma y el GABA que sintetiza se libera al espacio sináptico por despolarización y de manera dependiente de Ca^{2+} . El GABA liberado ejerce su acción sobre receptores específicos tipo A en neuronas postsinápticas. Las terminales nerviosas y las células gliales presentan sistemas de transporte de alta afinidad dependientes de Na^+ y Cl^- . Una vez capturado el GABA, la enzima encargada de su degradación, la GABA-T, lo transforma de nuevo en ácido glutámico (Tomado de Tapia, 1983).

TERMINAL PRESINAPTICA



neuronas con sinapsis dendrodendríticas, axosomáticas y axodendríticas. Sin embargo, la GAD₆₅ se expresa principalmente en neuronas de los sistemas visual y neuroendócrino, tales como: el núcleo geniculado lateral, el colículo superior, el núcleo pretectal olivar y en los núcleos hipotalámico y pontino. La asociación de la GAD₆₅ y el PLP depende de metabolitos energéticos (ATP, Pi), que durante la hiperactividad neuronal provocada por estímulos externos, incrementan su recambio. Así, el Pi favorece la formación de la holoGAD, y ésta a su vez la síntesis de GABA. Esto sugiere que la GAD₆₅ es capaz de responder a cambios a corto plazo en respuesta a alteraciones en la transmisión cerebral.

Otra función de la GAD₆₅ está relacionada con el sistema reproductor. *Tillakaratne y col.* en 1992, demostraron que existe una expresión diferente de la apoenzima y de la holoenzima en el sistema reproductor femenino o masculino de la rata. Utilizando anticuerpos para cada una de las dos GADs, se ha observado que las dos enzimas se presentan en la mucosa del epitelio del oviducto de la rata, siendo más reactiva la apogAD. En el testículo de la rata es más reactiva la holoenzima. Esta distribución desigual refleja un papel distinto para las dos enzimas: probablemente una esté involucrada en el movimiento ciliar de los espermatozoides y la otra esté asociada con una función secretora durante la reproducción.

b) HOLOGAD

La holoenzima se encuentra soluble en el sinaptoplasma (*Tapia,*

1983), tiene un peso molecular de 67 KDa por lo que se denomina GAD₆₇ (Erlander y col., 1991). El PLP se encuentra pegado a la enzima por un enlace covalente (Tapia y Sandoval, 1971; Bayón y col., 1977; Covarrubias y Tapia, 1980; Martin y col., 1991a, 1991b; Kaufman y col., 1991; Denner y Wu, 1985). Esta enzima utiliza probablemente como sustrato al ácido L-glutámico proveniente del ciclo de Krebs para la síntesis del GABA, el cual se libera al espacio sináptico por estímulos despolarizantes de una manera dependiente de calcio (Tapia, 1983) (Figura 1).

La holoGAD se encuentra distribuida principalmente en los somas y en las dendritas (Erlander y col., 1991), o a lo largo de toda la neurona de las células cerebrales de diferentes regiones: la corteza, los bulbos olfatorios, el septum, el globo pálido y el cerebelo (Feldblum, 1993; Erlander y col., 1991). Estas regiones son ricas en GABA y fierro (Fe²⁺), por lo que probablemente ambos participen en el metabolismo GABAérgico. El fierro es el cofactor de la enzima encargada de reciclar el GABA al ciclo de Krebs, la succinato deshidrogenasa (Hill y Switzer, 1984).

En el cerebro de mamíferos se han descrito otras vías para la síntesis del GABA, sin embargo, parecen no ser tan importantes como la vía de descarboxilación del glutamato. Entre estas se encuentra la de la putrecina, la cual proviene de la descarboxilación de la ornitina (Seiler y Altherib, 1974). Recientemente se ha propuesto otra vía a partir de homocarnosina (GABA-L-histidina). Este precursor se encuentra en la corteza, el cerebelo, los bulbos olfatorios y el hipocampo de la rata. Utilizando a la enzima

carnosinasa, la homocarnosina se hidroliza y forma GABA (Jackson y col., 1994).

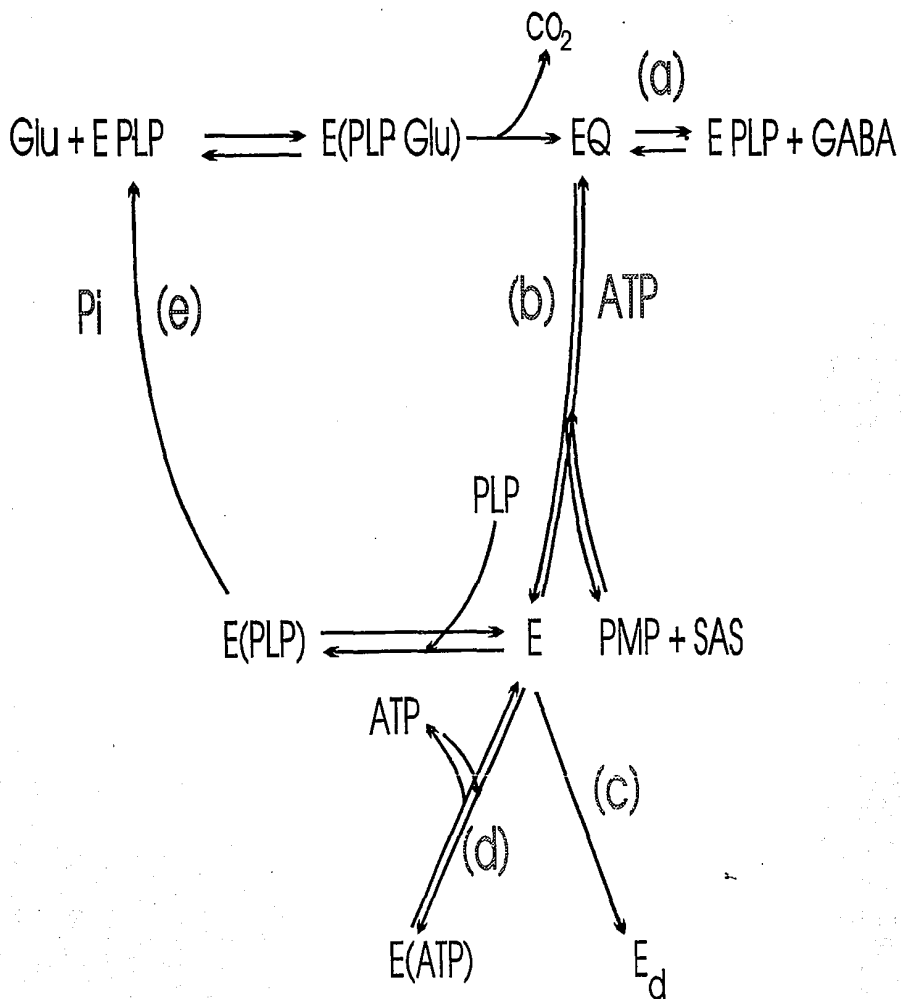
c) MECANISMOS DE REGULACION DE LA GAD

Hay muchos factores que intervienen en la regulación de la actividad de la GAD que deben tomarse en cuenta, ya que esta enzima está ampliamente ligada a los mecanismos de inhibición GABAérgica del SNC.

La holo y la apoenzima se pueden interconvertir mediante una serie de reacciones intrínsecas al metabolismo de la GAD (Tapia, 1983; Martin y Rimvall, 1993) (Figura 2). La holoGAD (E-PLP) utilizando como sustrato al glutamato (glu), es capaz de formar un intermediario quinoide, el cual puede seguir dos caminos: por un lado, puede formar GABA (a); y por otro lado, por una reacción de transaminación forma apoGAD (E) y piridoxamina-5'-fosfato (PMP) + semialdehído succínico (SAS) (b). El PLP se disocia fácilmente de la GAD, dando lugar a la apoGAD. La formación de esta apoenzima, también se favorece en condiciones de ausencia del cofactor. La presencia de éste último es capaz de reactivar a la enzima y formar holoGAD.

La cinasa del piridoxal (PK), es una enzima que se localiza en el sinaptoplasma de las terminales nerviosas. La PK utiliza ATP como donador de fosfato durante la fosforilación del piridoxal, para la formación de PLP (Figura 3). Por ello, mantiene las pozas endógenas necesarias de PLP que van a activar a la apoenzima (Tapia, 1983; Martin y Rimvall, 1993). A su vez, el PLP modula la

Figura 2. Mecanismo de interconversión de la holoGAD y la apoGAD. La holoenzima en presencia de glutamato mediante una reacción de descarboxilación forma GABA. El ATP tiene efectos alostéricos sobre la holoenzima, de tal manera que su presencia favorece la formación de la apoenzima y piridoxamina-5'P + semialdehído succínico. La presencia de PLP y el efecto alostérico del Pi sobre la GAD, favorecen la activación de la holoenzima. E, apoGAD; PLP, fosfato de piridoxal; E-PLP, holoGAD; E(PLP), apoGAD con pegado reversible de PLP; EQ, intermediario quinóide; PMP, piridoxamina-5'P; SAS, semialdehído succínico; Ed, GAD térmicamente desnaturizable (Ver texto, tomado de Martin y Rimvall, 1993).



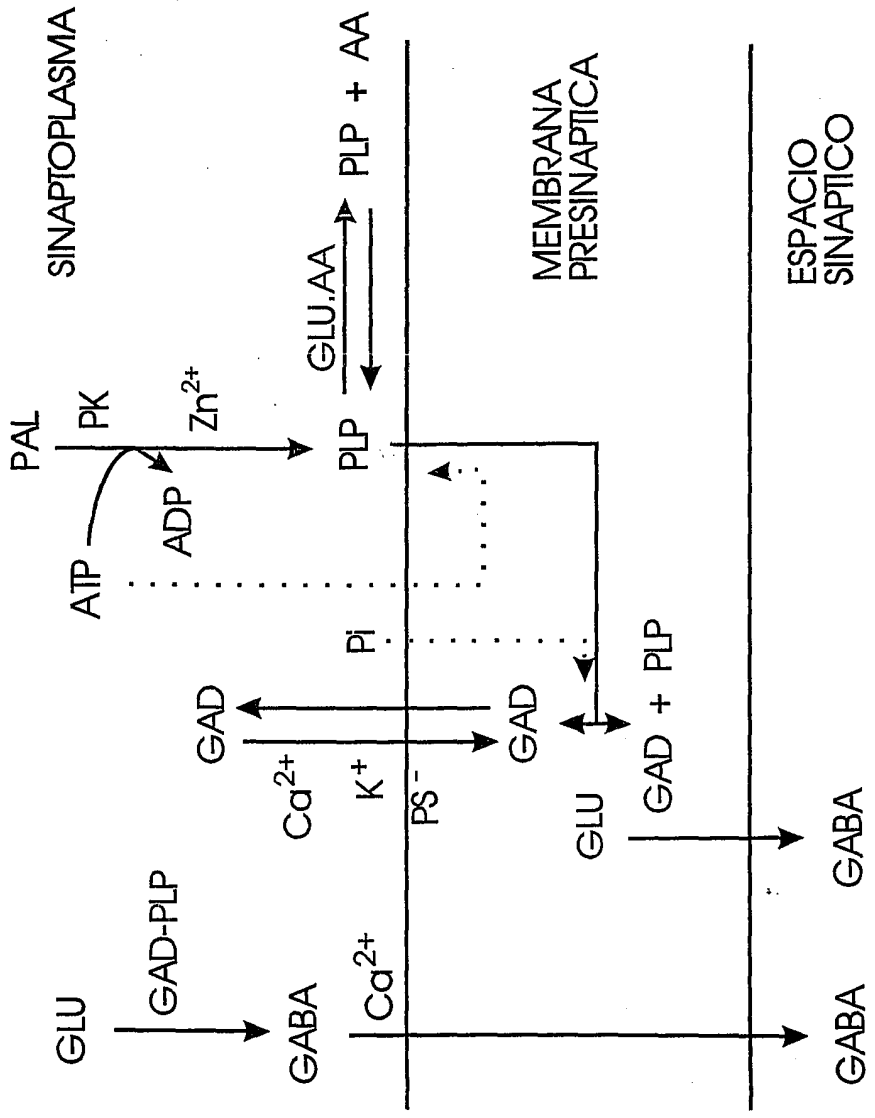
cantidad de holoenzima activa. Si el PLP está en exceso, el ATP se disocia de la enzima, a menos que haya suficiente cantidad de Pi para impedirlo (Tapia, 1983) (Figura 3). La administración de la 4-desoxipiridoxina-5-P, inhibe el pegado del PLP a la GAD, favoreciendo de esta manera la formación de la apoGAD.

Es importante considerar los niveles endógenos de algunos aminoácidos que actúan como reguladores de la GAD (Tapia, 1983). El GABA mismo puede actuar como inhibidor competitivo de la enzima por un mecanismo de retroalimentación negativa (Grossfeld y col., 1984; Sze y Lovell, 1970; Porter y Martin, 1984). También *in vitro*, en preparaciones sinaptosomales el GABA que se libera es capaz de inhibir la actividad de la GAD si sus niveles están por encima de lo que se requiere. Si están disminuidos, se incrementa la síntesis del GABA (Lidén y col., 1987). Otros aminoácidos interactúan con el PLP formando bases de Schiff, y de esta manera pueden regular a la enzima (Figura 3). El ácido glutámico, ya sea glial o neuronal, es muy importante por ser el sustrato que utiliza la enzima en la síntesis del GABA, por ello, puede estimular o disminuir la actividad de la GAD. La reducción en la disponibilidad de glutamato reduce la síntesis de GABA. La glutamina por ser a su vez precursor del glutamato, también puede regular a la enzima y por lo tanto, los niveles de GABA. Por ello, la limitación de la glutamina disminuye la concentración de GABA (Figura 1).

Existen otros factores endógenos que regulan la actividad de la GAD como son el ATP y el Pi (Kaufman y col., 1991; Erlander y Tobin, 1991; Tapia, 1983; Martin y Rimvall, 1993). El ATP además de

Figura 3. Regulación de la actividad de la GAD₆₅.

La GAD que se encuentra pegada a la membrana por interacciones electrostáticas mediadas por Ca^{2+} y/o por K^+ , requiere la presencia de un cofactor para su activación, el fosfato de piridoxal (PLP). La disponibilidad de PLP libre en el sinaptoplasma depende de la fosforilación, mediante una cinasa que requiere Zn^{2+} y ATP (piridoxal cinasa; PK), de alguno de los componentes de la vitamina B₆, como el piridoxal (PAL). Por otro lado, la disponibilidad del PLP también se regula mediante la formación de bases de Schiff en presencia de aminoácidos (AA) como el glutámico (GLU). El fosfato inorgánico (Pi) puede antagonizar la disociación GAD-PLP promovida por glutamato y estimulada por ATP. (Tomado de Tapia, 1983).



mantener los niveles de PLP como mencionaba anteriormente, es un inhibidor indirecto de la apoenzima, que no se pega al sitio del glutamato ni desplaza al PLP de la enzima, sino que actúa en un sitio alostérico. A temperaturas fisiológicas la apoenzima es capaz de desnaturalizarse (Ed) (Figura 2, c), y la presencia de ATP mantiene estable a la enzima (Figura 2, d) (Martin y Rimvall, 1993). La holoenzima en presencia de ATP favorece la formación de la apoenzima activando la vía de la PMP y el SAS (Figura 2, b). El efecto contrario ocurre en presencia de P_i , el cual activa la síntesis de la holoenzima (Figuras 2e y 3).

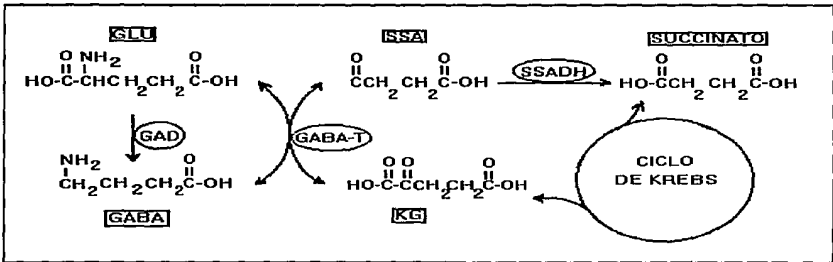
Otros compuestos también podrían regular a la GAD; sin embargo, se requieren concentraciones mayores a las que se encuentran intracelularmente. Entre estos se encuentran los intermediarios del ciclo de Krebs que son eficientes sólo a concentraciones mayores a 1 mM (Martin y Rimvall, 1993).

Algunos iones como el zinc podrían tener un papel en la regulación de la actividad de la GAD, ya que sus niveles fisiológicos son suficientes para activar a la cinasa del piridoxal, la cual regula los niveles de PLP necesarios para la activación de la GAD (Tapia, 1983) (Figura 3).

Por otro lado, es posible regular a la GAD a nivel genético, a nivel de RNAm, traducción o estabilidad de la proteína. La expresión de los dos tipos de GAD se regula de manera diferente. La holoenzima parece regularse por el GABA intracelular mediante dos mecanismos, uno transcripcional y otro a nivel de traducción (Martin y col., 1993; Rimvall y Martin, 1992, 1994).

2.2. GABA-T

Posteriormente a la acción del GABA sobre sus receptores, éste se elimina del espacio sináptico por un sistema de captura de alta afinidad dependiente de sodio y cloro, que se localiza tanto en las células gliales como en las terminales GABAérgicas. Una vez capturado el GABA, éste se degrada por un mecanismo de transaminación mediante la GABA-T (Tapia, 1983), la cual utiliza



α -cetoglutarato para formar de nuevo glutamato y también semialdehído succínico. Este último es el sustrato de la semialdehído succínico deshidrogenasa para formar ácido succínico.

La GABA-T es una enzima que se localiza en las mitocondrias de las neuronas cerebrales. La inhibición de esta enzima incrementa la acumulación de GABA en las terminales presinápticas y esto puede tener un efecto funcional importante. Se han utilizado diferentes inhibidores de la GABA-T por sus efectos anticonvulsivos en diferentes modelos de epilepsia. Sin embargo, la disminución de la excitabilidad neuronal no siempre se favorece por el incremento en la acumulación de GABA como se mencionará más adelante.

3. RECEPTORES

Posteriormente a la síntesis y liberación del GABA, éste aminoácido ejerce su acción sobre proteínas específicas. En el caso del GABA son de 2 tipos: receptor GABA_A y receptor GABA_B (Bormann 1988; Olsen y Tobin, 1990).

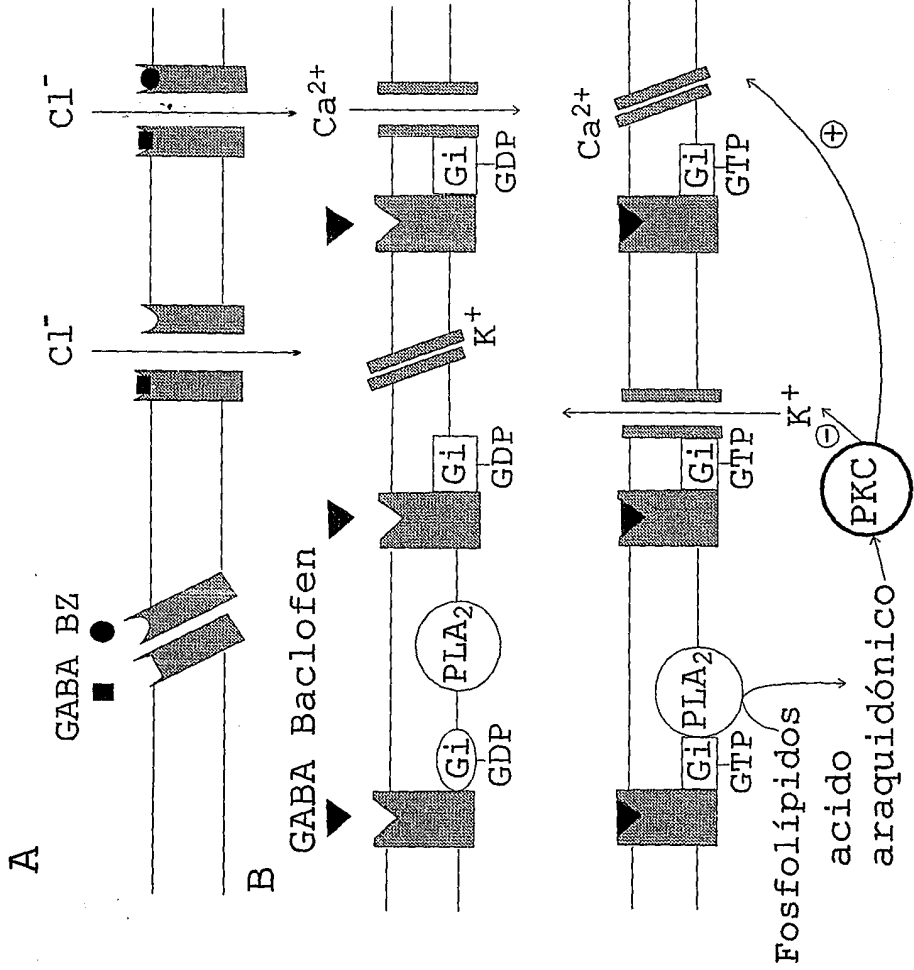
Receptor GABA_A:

El GABA_A es un receptor postsináptico (DeLorey y Olsen, 1992), que se activa con GABA o con análogos estructurales a éste como el muscimol, producto natural proveniente del hongo alucinógeno *Amanita muscaria*, ó el 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolpiridinol (THIP) que es un análogo sintético. El receptor está acoplado a un canal de cloro, que al activarse produce una hiperpolarización, y de esta manera inhibe la excitabilidad neuronal (Figura 4, A). El receptor posee diferentes sitios de reconocimiento: uno es específico para el GABA mismo o su agonista el muscimol, aunque también reconoce a la bicuculina que es un antagonista competitivo. Otros sitios del receptor son para las benzodiazepinas (BZ), los barbitúricos (Bb; en este sitio también se reconoce al etanol), los esteroides, y otro sitio para un convulsivante que se obtiene de las plantas; la picrotoxina, la cual disminuye la conductancia del cloro. Este último sitio reconoce a su vez a otro agente epiléptico, el TBPS

Figura 4. Modelos de los receptores GABA_A (postsináptico) y GABA_B (presináptico).

A) El receptor GABA_A está integrado por un canal que se activa permitiendo el paso de Cl⁻ (representado como una flecha) en presencia de su ligando, el GABA (denotado como una flecha). Este receptor puede modularse por la presencia de benzodiazepinas (BZ), las cuales incrementan el flujo del cloro a través del canal (flecha más gruesa).

B) El receptor GABA_B puede acoplarse a canales de Ca²⁺ y de K⁺, ya sea vía proteínas G dependientes de GDP o de GTP; o mediante mensajeros intracelulares vía proteína cinasa C (PKC). La PKC se estimula por el ácido araquidónico, producto de la actividad de la fosfolipasa A₂ (PLA₂). La PLA₂ también se activa por proteínas G. (Tomado de Bormann, 1988).



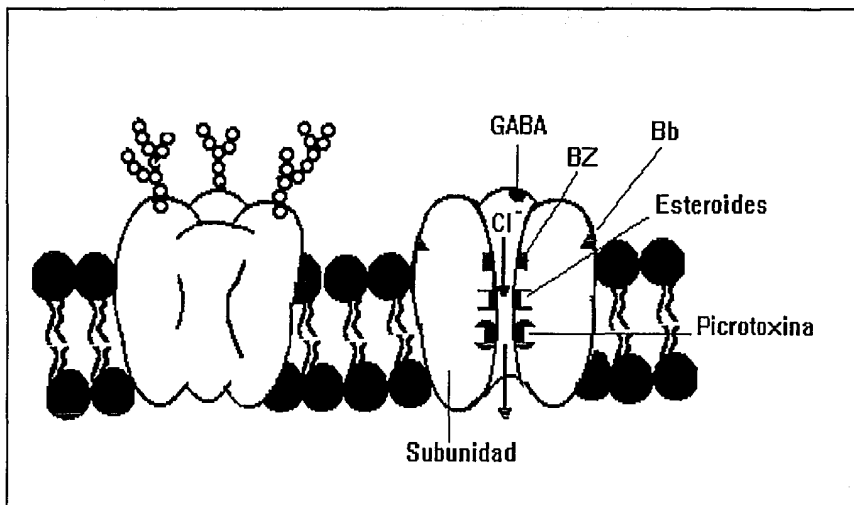


Figura 5. Modelo de los sitios específicos para el pegado de agonistas y antagonistas del receptor de GABA.

El receptor GABA_A está acoplado a un canal que permite el paso del ión cloro. El flujo de cloro depende la activación del receptor al pegarse el GABA a un sitio específico. Esta respuesta del receptor se estimula con agonistas o se inhibe con antagonistas que se pegan al mismo sitio que el GABA. También se bloquea con picrotoxina que se pega a un sitio distinto. Además, existen sitios diferentes para los moduladores de este receptor, las benzodiazepinas (agonistas y agonistas inversos), barbitúricos y esteroides, los cuales actúan en sitios específicos. (Tomado de DeLorey y Olsen, 1994).

(t-butilbiciclofosforotionato) que también bloquea el canal iónico (Figura 5).

El receptor está formado por diferentes subunidades: α , β , γ , δ y ϕ , de las cuales existen varios subtipos $\alpha(1-6)$, $\beta(1-4)$, $\gamma(1-3)$, δ y ϕ . Las diferentes combinaciones de estas subunidades proporcionan una amplia diversidad en las propiedades farmacológicas de este receptor (DeLorey y Olsen 1992). La subunidad β reconoce al GABA o a sus agonistas. La combinación de subunidades α , β y γ en general controla la interacción del GABA con el receptor y la acción de sus moduladores.

Por otro lado, las benzodiazepinas (DeLorey y Olsen, 1992) son importantes porque modulan la respuesta del receptor incrementando la frecuencia de apertura del canal. Este efecto se inhibe con los llamados agonistas inversos de las benzodiazepinas (β -carbolinas) que disminuyen la corriente de cloro inducida por el GABA (Bormann, 1988) (Figura 4, A). La subunidad $\alpha-6$ parece ser el sitio para el pegado del agonista inverso Ro15-4513. Los barbitúricos y los esteroides que también son moduladores, se pegan a un sitio de la subunidad $\beta-2$ e incrementan la respuesta del GABA. La subunidad ϕ se expresa sólo en la retina. La subunidad $\gamma-2$ es un sitio para la modulación de la respuesta al GABA por etanol (DeLorey y Olsen, 1992).

Se sabe que en la epilepsia inducida por pentilentetrazol, bicuculina y picrotoxina se bloquea la respuesta del receptor GABA_A, y disminuye la hiperpolarización debida a la entrada del ión Cl⁻, lo que produce una desinhibición en la actividad neuronal,

favoreciendo la aparición de crisis convulsivas (Matsumoto, 1989). Los barbitúricos, las benzodiazepinas y los agonistas de GABA aumentan la entrada de Cl^- y por ello protegen de las crisis. Esto ha sugerido que una deficiencia en la actividad de los receptores $GABA_A$ podría estar asociada con la epilepsia.

Receptor $GABA_B$:

El receptor $GABA_B$ es presináptico y está acoplado a canales de calcio y potasio por proteínas dependientes de guanosina trifosfato (GTP) (Bormann, 1988). La inhibición inducida por la unión del GABA a este receptor, puede seguir dos caminos: el primero involucra segundos mensajeros. En este se activa la fosfolipasa- A_2 vía proteína G para formar ácido araquidónico, que a su vez activa a una proteína cinasa C (PKC). La PKC inhibe a un canal de calcio y estimula a uno de potasio (Figura 4, B).

El otro camino es cuando el receptor está acoplado directamente al canal de calcio (Figura 4, B). Se sabe que las corrientes de calcio controlan la liberación de transmisores de las terminales nerviosas. Un agonista de este receptor-B es el baclofen y un antagonista es el flaclofen.

4. EL GABA Y LA EPILEPSIA

El estudio de los posibles mecanismos de acción que ocurren durante la epilepsia, ha mostrado alteraciones en la transmisión GABAérgica, principalmente a nivel de: a) degeneración de las terminales GABAérgicas; b) interferencia con la acción sobre

receptores específicos debidos al bloqueo del receptor GABA_A, a los cambios en la cantidad de receptores disponibles, o en la afinidad del neurotransmisor por su receptor; c) reducción en la concentración endógena del GABA, por la inhibición en la síntesis del neurotransmisor, por el incremento en la actividad de los sistemas de degradación del neurotransmisor, o por un decremento en la liberación del aminoácido (Tapia, 1991).

a) Pérdida neuronal

En diferentes modelos de epilepsia, por ejemplo en epilepsia del lóbulo temporal en humanos, o en monos a los que se les administra gel de alumina en la corteza (Ribak y col., 1986), se ha demostrado una disminución en el número de sinapsis GABAérgicas y la aparición de gliosis en el foco epiléptico, probablemente por un aumento en la actividad convulsiva debido al decremento en la función inhibidora. Las técnicas de inmunocitoquímica demuestran que los somas de las células GAD-positivas disminuyen entre 24 y 52% en este foco.

b) Bloqueo de receptores:

El efecto predominante del GABA es la interacción con receptores específicos y el mantenimiento de un flujo de cloro, a través de los canales acoplados a éstos. Esta acción produce una hiperpolarización y con ello la inhibición de la actividad neuronal. Las alteraciones en los receptores GABA_A pueden desarrollar epilepsia. Algunos estudios apoyan una relación entre

los niveles de GABA y la aparición de crisis epilépticas. En el líquido cefalorraquídeo de pacientes con epilepsia o en niños con convulsiones febriles, se ha demostrado una disminución en la concentración del GABA (Manyam y col., 1980). Por otro lado, también se han observado en el 60% de los casos de los pacientes con epilepsia intratable, cambios en la concentración de GABA endógeno y una disminución en la actividad de la GAD (Lloyd y col., 1986). En animales, la bicuculina y la picrotoxina se utilizan comúnmente como epileptogénicos por su efecto bloqueador de los receptores GABA. Estos trabajos sugieren que la inhibición en la transmisión GABAérgica, y la disminución de la respuesta de sus receptores pueden estar asociadas con la epilepsia (Tapia, 1975). Así, los ligandos específicos para este receptor, como los barbitúricos, las benzodiazepinas, el muscimol, o el mismo GABA, incrementan la actividad del receptor GABA, y ofrecen una acción protectora contra diferentes modelos de epilepsia (Matsumoto 1989).

c) Inhibición de la GAD

La disminución en la actividad de la GAD produce un decremento en las pozas endógenas del GABA, el cual es necesario para mantener una inhibición tónica.

Los inhibidores competitivos de la GAD producen epilepsia. El ácido 3-mercaptopropiónico induce crisis en tiempos muy cortos después de su administración (Tapia, 1975b), lo cual disminuye su liberación al espacio extracelular, determinada por técnicas de push-pull (Van der Heyden y col., 1979). Esto demuestra la

importancia de esta enzima para mantener un nivel adecuado de excitación neuronal.

En un modelo de convulsiones febriles en ratas jóvenes (Arias y col. 1992), se demostró que la hipertermia es otra forma de epilepsia en la que disminuye la actividad de la GAD. En estos animales los niveles endógenos de GABA también disminuyen y probablemente la causa de que aparezcan crisis se debe a una disminución en la eficiencia inhibitoria.

Por otro lado, las dietas deficientes en vitamina B₆ o en alguno de sus componentes, el piridoxal, la piridoxina (Dakshinamurti y Stephens, 1969) y la piridoxamina, así como la utilización de análogos estructurales, como la 4-desoxipiridoxina, o las hidrazidas, también son capaces de producir convulsiones o incrementar la susceptibilidad a ellas (Coursin, 1960; Killam, 1960). Los efectos pueden revertirse administrando PLP, vitamina B₆ o GABA. Los mecanismos de acción asociados con estas crisis tienen que ver con la inhibición de la cinasa del piridoxal, el bloqueo de la síntesis del PLP o la competencia con el PLP por sus sitios de pegado en la apoenzima. La reversión de las crisis y la desinhibición de la enzima se obtiene mediante la adición de PLP o de piridoxina a la dieta.

Sharma y Dakshinamurti en 1992 demostraron que una dieta deficiente en piridoxina durante 10 semanas, produce una actividad convulsiva espontánea. Los animales al tener menor disponibilidad por el PLP libre, necesario como cofactor para la GAD, tienen disminuída la actividad de esta enzima, lo cual favorece un

incremento en la sensibilidad a las crisis epilépticas inducidas por picrotoxina.

Tapia y col. (1969) y Pérez de la Mora y col. (1973) utilizaron ratones a los que se les administró γ -glutamihidrazona. Este compuesto forma una hidrazona en presencia de PLP, lo que inhibe a la cinasa del piridoxal. Los datos de estos experimentos sugieren que los animales tratados con esta droga convulsionan como consecuencia de un decremento en la concentración de PLP libre en el sinaptoplasma, y por ello, en la actividad de la GAD.

En un modelo de epilepsia inducido por la administración intraperitoneal de la hidrazona del ácido glutámico en ratas jóvenes, se observó que esta droga que afecta directamente a la GAD, produce crisis tónico-clónicas. Los homogenados del cerebro de estos animales, presentan un decremento tanto en los niveles de GABA como en la actividad de la GAD (Massieu y col., 1994).

Otros agentes epileptogénicos atrapadores del grupo carbonilo también son capaces de afectar la actividad de la GAD tanto *in vivo* como *in vitro* al combinarse con el grupo aldehído del PLP. Estos son menos potentes que los derivados de las hidrazinas, y entre ellos se encuentran la cicloserina, la hidroxilamina, el ácido amonooxiacético, etc. (Roberts y col., 1964).

En diferentes modelos de epilepsia, el incremento en la concentración endógena de GABA, favorece una transmisión GABAérgica adecuada. Kendall y col. en 1981 demostraron que varias horas después de administrar γ -vinil-GABA (GVG) sistémicamente en ratones, el cual inhibe a la enzima encargada de la degradación del

GABA, los niveles de GABA se incrementan, y disminuyen las crisis tónico-clónicas inducidas por bicuculina o picrotoxina.

Löscher y col. en 1989 vieron que el ácido aminooxiacético (AOAA) administrado sistémicamente, a los 30 min inhibe la GABA-T en diferentes regiones cerebrales de rata: la corteza frontal, el estriado, el hipocampo, el tálamo, la sustancia nigra, el cerebelo, etc., y al mismo tiempo se incrementan los niveles de GABA en estas mismas regiones. La conducta de los animales es normal y no se afecta la actividad de la GAD, ya que se requieren concentraciones elevadas de AOAA para inhibirla. Estos resultados sugieren que diferentes inhibidores de la degradación del GABA pueden utilizarse como antiépilépticos al incrementar los niveles endógenos de GABA.

Un estudio de la administración intraperitoneal de GVG, durante 12 días, en diferentes regiones cerebrales de rata, muestra un aumento en la concentración de GABA de la corteza, el hipocampo, el cerebelo, la médula espinal y el líquido cefalorraquídeo. La concentración de otros aminoácidos como el glutamato y el aspartato baja ligeramente. Por otro lado, la determinación del efecto de GVG sobre la unión de benzodiazepinas, las cuales son ligandos específicos del receptor GABA_A, no muestra ninguna diferencia. Esto sugiere que el aumento de GABA y el decremento en los niveles de aminoácidos excitadores podrían ser los que producen un efecto anticonvulsivante (Halonen y col., 1991). Sin embargo, otros estudios han demostrado que los inhibidores de la GAD tanto *in vivo* como *in vitro* son capaces de inducir epilepsia, independientemente de los niveles de GABA, produciendo una desinhibición del sistema

GABAérgico (Meldrum, 1975; Tapia, 1975; Tapia y col., 1975). Estudios previos han demostrado que los niveles de GABA se incrementan al administrar la γ -hidrazida del ácido glutámico, que bloquea a la GABA-T. La inyección simultánea de PLP, a pesar de incrementar los niveles de GABA, produce una inhibición de la GAD y por ello de la síntesis del GABA, presentándose entonces una conducta convulsiva (Tapia y Awapara, 1967).

Matsui (1978) mostró que en ratas inyectadas bilateralmente en la sustancia nigra (SN) con gabaculina, otro inhibidor específico de la GABA-T, la concentración de GABA se incrementa hasta 11 veces. A las 5 h las ratas muestran algunas alteraciones motoras, como hiperactividad, estornudos y movimientos de cabeza. Esta conducta se previene con la administración bilateral de dosis subconvulsivas de picrotoxina (0.05 μ g/0.5 μ l). A las 24 h aumentan la conducta ambulatoria, y ésta se inhibe totalmente con la aplicación de picrotoxina en una dosis subconvulsiva mayor (0.15 μ g/0.5 μ l). Estos experimentos sugieren que este tipo de conducta está mediado por sinapsis GABAérgicas.

Por otro lado, en cultivo de células neuronales de retina de pollo, la administración crónica de GABA, durante 7 días, disminuye la actividad de la GAD. El tratamiento con picrotoxina previo a la adición de GABA, impide que ocurra esta alteración de la enzima (De Mello, 1984; De Mello y col., 1991). Estos experimentos implican, aunque no se sabe de qué manera, una relación entre el receptor GABA_A y la actividad de la GAD durante la exposición prolongada del agonista natural.

En 1979 Perry y col. demostraron que la administración crónica de GVG subcutánea en ratas, durante 11 días, incrementa 150% el contenido de GABA. En homogenados del cerebro de estos animales se observa que la actividad de las enzimas GABA-T y GAD, disminuyen aproximadamente un 25%. Las ratas no presentan cambios en la conducta ni evidencia de toxicidad. En este trabajo se sugiere que la GAD cerebral es capaz de disminuir como resultado de una inhibición por producto, causada por la exposición prolongada a concentraciones elevadas de GABA.

Posteriormente, Sykes y col. (1984), mostraron que con otro inhibidor de la GABA-T, la etanolamina-O-sulfato (EOS) administrada oralmente durante 28 días en ratas, se incrementaba el número de sitios expuestos de los receptores GABA_A y GABA_B (up-regulation), sin ningún cambio en la afinidad. En estos animales, de los cuales no se hizo un estudio conductual ni electroencefalográfico, la concentración de GABA se incrementó 4 veces aproximadamente y la actividad de la GAD bajó hasta un 40%. Por ello, los autores sugieren que el estímulo que incrementa el número de sitios es la reducción en el GABA liberable subsecuente a la reducción en la actividad de la GAD. Una semana posterior al tratamiento, la actividad y los niveles de GABA regresan a su valor inicial.

En un trabajo más reciente, Neal y Shah (1990) observaron que la administración de GVG intraperitoneal en forma aguda o crónica (durante 17 días), incrementa los niveles de GABA en la corteza cerebral sin afectar la concentración de otros aminoácidos. La liberación de GABA endógeno, estimulada por concentraciones

elevadas de potasio (50 mM), se incrementa en el tratamiento agudo y se reduce a la mitad en el crónico. La actividad de la GAD en el tratamiento agudo no se afecta, sin embargo, en el crónico disminuye aproximadamente un 50%. Los experimentos indican que probablemente se desarrolla un fenómeno de tolerancia por el efecto prolongado de GVG. Esto puede ser porque la exposición prolongada al GABA esté afectando la síntesis del aminoácido, y por lo tanto su liberación, y con ello, su efecto sobre los receptores GABA_A.

En experimentos *in vitro* utilizando neuronas cerebrales en cultivo de corteza de rata, Rimvall y Martin (1992) demostraron que el tratamiento crónico con GVG durante 5-10 horas, también inhibe a la GABA-T y a la GAD y aumenta la concentración extracelular de GABA. Además en estos experimentos también se produce un decremento en la cantidad de proteína específico para la GAD₆₇. Estos mismos resultados han sido confirmados en experimentos *in vivo*, en ratas tratadas con GVG durante 10 días. En los experimentos *in vitro*, ni el baclofen ni el muscimol tienen efecto sobre la GAD, lo cual descarta un posible efecto sobre los receptores de GABA. Los autores interpretan estos resultados en el sentido de que la exposición prolongada de GABA afecta directamente la síntesis de la GAD (Rimvall y Martin, 1992, 1994).

Ahora bien, como ya se ha mencionado, no necesariamente los niveles elevados de GABA ofrecen un efecto antiepiléptico. Otro modelo, en el cual se presenta epilepsia a pesar del mantenimiento elevado de GABA es el Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG), del cual se hablará a continuación.

d) Síndrome de abstinencia al GABA

Estudios en monos fotosensibles (*Brailowsky y col., 1987*) o en ratas con kindling amigdalino (*Fukuda y col., 1987*), muestran que la infusión intracortical de GABA 100 μM durante 7 días, tiene efectos anticonvulsivos durante el registro de la actividad eléctrica cerebral, determinada mediante técnicas electroencefalográficas (EEG). Sin embargo, la interrupción del tratamiento produce espigas focales paroxísticas en el sitio de infusión tanto en los animales epilépticos como en los no epilépticos utilizados como control. A esto se le ha dado el nombre de "síndrome de abstinencia al GABA" (SAG) (*Brailowsky y col., 1987, 1988, 1990, 1992; Fukuda y col., 1987; Silva-Barrat y col., 1989, 1992; Menini y col., 1991*).

El SAG es un tipo de epilepsia parcial que se caracteriza por descargas paroxísticas que comienzan en el sitio de infusión. Conductualmente los animales pueden presentar movimientos clónicos contralaterales en las extremidades posteriores del cuerpo. Las descargas pueden durar varios días y después desaparecer. Semejantes alteraciones de la conducta motora se pueden presentar al interrumpir un tratamiento crónico con drogas anticonvulsivas como las benzodiazepinas, los barbitúricos, los esteroides o el alcohol, las cuales tienen una acción directa sobre el receptor GABA_A (*Saunders y col., 1990; File, 1990*). Estudios farmacológicos preliminares han demostrado que el SAG es poco sensible al efecto de fármacos como los barbitúricos, la fenitoína, la carbamazepina, el valproato, la progabide, las benzodiazepinas, y a algunos

antagonistas de los aminoácidos excitadores como el aminofosfonoheptanoato, la ketamina o el MK-801, por lo que se considera un tipo de epilepsia intratable. El síndrome sólo interrumpe su actividad eléctrica paroxística en presencia de GABA (Brailowsky y col., 1990), o en presencia de 3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida. Esta última se ha observado que presenta una terapéutica efectiva en animales a los que se les indujo epilepsia por electroshock o por bicuculina (Carvajal y col., 1964).

Experimentos que determinan la utilización de [^{14}C]-2-desoxi-D-glucosa en diferentes áreas corticales durante el SAG, confirman la localización focal de este tipo de epilepsia (Menini y col., 1991). Estos trabajos muestran un incremento importante en el sitio de infusión de GABA y cambios secundarios en el tálamo. Se ha sugerido que el tálamo juega un papel en el mantenimiento de la actividad neuronal paroxística que se presenta en diferentes modelos de epilepsia (Liu y col., 1991; Collins y Olney, 1982; Miller y Ferrendelli, 1990).

Los registros de la corriente intracelular en rebanadas de cerebro de ratas con SAG, han mostrado dos tipos de neuronas, unas que responden a la estimulación sináptica y otras con propiedades intrínsecas que producen descargas espontáneas. Las neuronas intrínsecas parecen ser más importantes para el SAG. Estas se sitúan en la periferia de la lesión debida a la cánula de infusión, que corresponde al sitio de mayor utilización de glucosa. Las neuronas intrínsecas son poco sensibles a la adición de GABA o de isoguvacina, que es un agonista del receptor GABA_A. La disminución

en la sensibilidad de estas neuronas no es un fenómeno de desensibilización el cual normalmente aparece en escasos segundos, ya que el SAG se presenta de 10 a 30 minutos posteriores a la interrupción de la infusión de GABA y dura varios días. La desensibilización podría deberse a un estado de tolerancia por el tratamiento prolongado con GABA, como consecuencia en la disminución del número de receptores o a algún cambio en el estado de éstos, como la fosforilación. Esto disminuiría la eficacia GABAérgica permitiendo una desinhibición neuronal. Sin embargo, no parece ser que disminuya el número de receptores, ya que si se continúa con la infusión de GABA desaparece el SAG (Silva-Barrat y col., 1989).

Las lesiones inducidas por la infusión del GABA en la concentración que se usa para el SAG, no tienen un papel en el desarrollo del SAG, ya que la administración de otro aminoácido inhibidor como la taurina en concentraciones similares e infundida de igual manera, produce la lesión mecánica debida a la canulación, pero no induce SAG (Brailowsky y col., 1990).

El SAG es un modelo de epilepsia que se ha logrado reproducir *in vitro*. Utilizando rebanadas de hipocampo de rata y estimulando con corriente a las fibras aferentes de Schaffer, se producen descargas en las células piramidales hipocampales de la región CA₁, que estan mediadas por receptores de GABA. Las descargas se inhiben durante la incubación prolongada durante dos horas, con GABA 5 mM. El lavado del tejido incrementa la excitabilidad neuronal durante varias horas. La pérdida de inhibición se sugiere

puede ser debida a un decremento en el número de receptores o en su afinidad (García-Ugalde y col., 1992).

II OBJETIVOS

El conocimiento del SAG se ha basado principalmente en estudios electrofisiológicos, sin establecer definitivamente los mecanismos bioquímicos involucrados en su aparición y desarrollo. En el presente trabajo, se pretendió determinar si en dicho fenómeno participaba el metabolismo GABAérgico. Con este propósito se examinaron los siguientes parámetros:

I. *In vivo*:

1. Posibles cambios en la síntesis del GABA. Estos se realizaron mediante el análisis de la actividad de la GAD en la corteza motora y en la corteza occipital, ipsi y contralaterales al sitio de infusión, en ratas tratadas unilateralmente con GABA o con solución salina (control) en diferentes condiciones: previamente, durante o posteriormente al SAG, inducido por la interrupción del tratamiento con GABA.

2. Posibles modificaciones en la liberación endógena de los aminoácidos libres más abundantes en el sistema nervioso central: el ácido aspártico, el ácido glutámico, la glicina, la taurina, la alanina y el GABA.

Los animales se registraron electrocorticográficamente para determinar el inicio, el desarrollo y la desaparición del SAG.

II. *In vitro*:

En rebanadas de corteza y del área CA₁ del hipocampo de animales no epilépticos, se estudió el desarrollo del SAG en el tejido expuesto a GABA 5 mM, durante 2h. Para ello, se utilizaron las mismas condiciones experimentales reportadas previamente (García-Ugalde y col., 1992). En este sistema se realizaron las siguientes determinaciones:

1. La actividad de la GAD en rebanadas de la corteza y del área CA₁ del hipocampo, incubadas durante 2 h con GABA.
2. La liberación de GABA-³H de rebanadas de la corteza incubadas durante 4.30 h con GABA no marcado radioactivamente.

III METODOS EXPERIMENTALES

INFUSION DE GABA:

Se utilizaron ratas macho de 250 g que se anestesiaron con halotano para ser implantadas estereotácticamente con una cánula electrodo, en la corteza cerebral motora y occipital. Las coordenadas que se utilizaron tomando como referencia a bregma fueron: anteroposterior 2.0, lateral 2.0 y ventral 1.5 (Paxinos y Watson, 1986).

Una semana después de la recuperación postoperatoria de los animales, se infundieron 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{h}$ de GABA unilateralmente en la corteza motora durante 2 o 6 horas, mediante una bomba peristáltica, o durante 24 horas utilizando una minibomba osmótica, colocada subcutáneamente en el cuello del animal (Silva-Barrat y col., 1989). La solución de GABA para la infusión se disolvió en solución salina isotónica y se le añadió 1 mg/ml de un colorante inerte, el azul Directo-15 para establecer el sitio correcto de la infusión. El tejido que no se tiñó por la infusión, se descartó. (Información más detallada en el artículo anexo).

REGISTRO ELECTROENCEFALOGRAFICO (EEG):

Se utilizaron ratas macho de 250g a las que se les implantó unilateralmente una cánula-electrodo en la corteza motora. Una semana después de que los animales se recuperaron de la operación, se procedió al tratamiento de los animales con GABA o con solución salina como control. El registro de la actividad eléctrica tanto en

los animales tratados como en los controles, se realizó durante 30 a 60 min antes, durante la administración del GABA o de la solución salina, y se continuó registrando hasta 1 h después de la aparición de la primera descarga paroxística en el EEG durante el SAG. (Información más detallada en el artículo anexo).

GRUPOS DE ANIMALES:

Los animales se agruparon de acuerdo al tiempo de infusión de GABA (2, 6 o 24 h), y cada grupo se examinó durante diferentes tiempos de acuerdo al grado de desarrollo de la epilepsia registrada en el EEG:

PRE-SAG: Los animales fueron sacrificados por decapitación inmediatamente después de la infusión de GABA.

SAG: Los animales se sacrificaron 60 minutos ó 5 días después de la aparición de la primera descarga epiléptica registrada en el EEG, independientemente de su latencia.

POST-SAG: Los animales fueron sacrificados 1, 3 ó 10 días posteriores al término de la epilepsia registrada en el EEG.

CONTROLES: Como controles de los cambios inducidos por el tratamiento se utilizaron diferentes áreas corticales:

1. En animales no infundidos:

- a) La corteza motora de animales intactos.
- b) La corteza motora de animales lesionados (implantados).

2. En animales infundidos

- a) La corteza motora de animales infundidos con solución salina y azul directo.
- b) La corteza motora contralateral al sitio de infusión.
- c) La corteza occipital, ipsi y contralateral al sitio infundido.

(Para mayor información ver texto correspondiente en el artículo anexo).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD EN EL SAG *ex vivo*:

Los animales fueron sacrificados por decapitación inmediatamente después del término de la infusión (Pre-SAG) o 1 hora después de la aparición de la primera descarga epiléptica registrada en el EEG, durante el síndrome (SAG). Posteriormente, se separó la corteza. De las regiones motora y occipital de cada uno de los hemisferios cerebrales, se extrajo una porción mediante un sacabocados de 2 mm de diámetro interno, para lo cual se utilizó la punta plástica de una pipeta. La corteza occipital y la contralateral al sitio infundido se utilizaron como controles.

El tejido se homogenizó en 100 μ l de agua o de buffer de fosfato de sodio 50 mM y la actividad de la GAD se determinó de acuerdo a *Albers y Brady (1959)*, con algunas modificaciones previamente descritas por nosotros (*Tapia y Salazar, 1991*), tanto en presencia como en ausencia de condiciones saturantes de PLP (0.5 mM). (Información en el artículo anexo).

DETERMINACION DE LOS NIVELES DE AMINOACIDOS:

Utilizando los mismos homogenados de tejido antes mencionados, se tomó una alícuota para la determinación de la proteína de acuerdo al método de *Lowry y col.* (1951), y otra alícuota del homogenado del tejido para el análisis de aminoácidos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). A este último se le añadió ácido perclórico (concentración final 0.6%) para la extracción de los aminoácidos libres. Posteriormente se centrifugó, y el sobrenadante se neutralizó con KOH. Se volvió a centrifugar para sedimentar las sales de perclorato de potasio. Los aminoácidos extraídos se derivatizaron con ortoftaldialdehído (OPA) durante 3 minutos. Posteriormente se inyectaron 20 μ l de la muestra en el HPLC. El procedimiento de separación de los aminoácidos se realizó de acuerdo a *Geddes y Wood* (1984), utilizando una columna ODS para fase reversa y un gradiente lineal (del 25 al 75% de metanol) de una mezcla de metanol:buffer de acetato de potasio 0.1 M, pH 5.5. Los aminoácidos se detectaron en un fluorómetro y se identificaron y cuantificaron de acuerdo a los tiempos de retención de estándares internos y externos. (Información más detallada en el artículo anexo)

LIBERACION DE GABA-³H DE REBANADAS CON SAG *in vitro*:

La liberación de GABA-³H de rebanadas de 300 μ m de espesor de la corteza motora de animales de 120 g, se determinó mediante una técnica de superfusión continua (*Arias y Tapia, 1986*). Utilizando

2 rebanadas, el control se preincubó en 1 ml de un medio Krebs-bicarbonato (MK) pH 7.4, durante 10 minutos a 37°C, con agitación. Este medio está constituido por: NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.17 mM, CaCl₂ 2.5 mM, glucosa 10 mM y NaHCO₃ 25 mM. Para las condiciones experimentales, las rebanadas se incubaron en 50 ml de MK o MK + GABA 100 µM ó + muscimol 50 µM, durante 4.30 h, con un flujo de recambio de 5 ml/min, a 37°C con agitación y gaseo continuo con una mezcla de 95% oxígeno 5% CO₂. Se procedió con la reincubación del tejido tanto control como experimental, con GABA-(2,3-³H) (NEN. Actividad específica 24 Ci/mmol) en una concentración final de 0.83 µCi, 0.5 µM, durante 10 minutos a 37°C, con agitación. Posteriormente, el tejido se colocó sobre un filtro (Millipore de 0.65 µm) en una cámara de superfusión continua. Durante los primeros 5 minutos, se perfundió con MK a una velocidad de 1.5 ml/min, para lavar la posible radioactividad externa adherida al tejido. Posteriormente, se colectó cada minuto el perfusado a una velocidad de 0.5 ml/min, en presencia, o en ausencia del ión calcio + EGTA (100 µM). En el minuto 5 se estimuló la liberación de GABA-³H con potasio en concentraciones elevadas (47 mM). En el minuto 14, se colectó el filtro con el tejido. A cada muestra se le añadieron 5 ml de tritosol (Fricke, 1975) y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo para muestras líquidas. Los resultados expresan el cambio porcentual de la tasa de liberación, respecto al total de la radioactividad incorporada al tejido.

DETERMINACION DE LA GAD EN EL SAG REPRODUCIDO *in vitro*:

Utilizando ratas Wistar macho de 150 g, se extrajeron rebanadas del cerebro de 400 μm de espesor. Utilizando solamente la corteza motora y el hipocampo, el tejido control se incubó en 100 ml de MK durante 3 horas. El tratamiento experimental se realizó incubando el tejido en presencia de GABA 5 mM, durante 2 horas. Posteriormente, se cambió el medio de incubación por un MK fresco, para simular la interrupción del tratamiento de la infusión del GABA *in vivo*. En estas condiciones se analizó la actividad de la GAD, en los siguientes tiempos: a) Inmediatamente después de la exposición prolongada al GABA, cuando aún no se ha presentado el SAG (García-Ugalde y col., 1992); b) A los 60 minutos posteriores al término de la exposición al GABA, cuando el SAG ya está presente (García-Ugalde y col., 1992). Posteriormente, se utilizó la punta plástica de una pipeta Gilson como sacabocado (diámetro interno = 2 mm) y se extrajo la porción correspondiente a la corteza motora o al área CA₁ del hipocampo. La actividad de la GAD en las diferentes condiciones se comparó con los datos obtenidos en tejido fresco, recién extraído. El análisis de la actividad de la GAD se determinó de la misma manera que para el SAG *in vivo*, y que se menciona detalladamente en el artículo anexo.

IV TRABAJO PUBLICADO

Los resultados más importantes obtenidos en el presente proyecto se publicaron en el artículo que se anexa a continuación, y cuyo título es: Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of γ -aminobutyric acid, publicado en la revista Neurochem. Int. vol. 24, No. 4, pp. 363-368, 1994. Los resultados adicionales que no aparecen en el artículo se presentan en el siguiente apartado de la presente tesis.



DECREASE OF GLUTAMATE DECARBOXYLASE ACTIVITY AFTER *IN VIVO* CORTICAL INFUSION OF γ -AMINOBTYRIC ACID

PATRICIA SALAZAR, TERESA MONTIEL, SIMÓN BRAILOWSKY
and RICARDO TAPIA*

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253, 04510-México, D.F., México

(Received 23 September 1993; accepted 6 December 1993)

Abstract— γ -Aminobutyric acid (GABA) levels and the activity of glutamate decarboxylase were measured in homogenates of rat brain cortical tissue, at different times after chronic intracortical infusion of GABA *in vivo* during 2, 6 or 24 h. Cortical electrical activity was also recorded. As previously described, about 1 h after cessation of the infusion epileptic discharges were observed (GABA-withdrawal syndrome), which lasted for several days. At zero time after cessation of the infusion, before the appearance of seizures, GABA levels were increased 3–6-fold and glutamate decarboxylase activity was decreased 27–48% in the infused cortex, as compared to the contralateral cortex or to tissue from control intact rats. During epileptic discharges GABA levels gradually returned to normal values. In contrast, glutamate decarboxylase activity remained decreased during seizures and returned to normal only after recovery from the GABA-withdrawal syndrome. These results suggest that the persistent decrease in the activity of the decarboxylase is due probably to a lowered amount of the enzymatic protein, occurring as a consequence of a temporarily elevated intracellular GABA concentration. The decreased rate of GABA synthesis might be involved in the pathophysiology of the GABA-withdrawal syndrome.

Brain glutamate decarboxylase (L-glutamate-1-carboxy-lyase; EC 4.1.1.15; GAD) the enzyme responsible for the synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA), has been established as a critical factor in the control of motor excitability. Several studies have demonstrated a close link between the inhibition of its activity *in vivo* and the appearance of convulsions, independently of the concentration of GABA in brain (Meldrum, 1975; Tapia, 1975; Tapia *et al.*, 1975; Arias *et al.*, 1992). Therefore, it has been postulated that a synaptically active pool of GABA is released by a mechanism coupled to its synthesis (Tapia, 1975, 1976, 1983). Because of this, the regulation of GAD activity has been a subject of considerable interest. The most important mechanism in this regard seems to be the availability of its coenzyme, pyridoxal-5'-phosphate (PLP). Two molecular forms of the enzyme, with different affinity for the coenzyme, initially postulated on the basis of kinetic and inhibition studies (Tapia and Sandoval, 1971; Bayón *et*

al., 1977; Covarrubias and Tapia, 1980) have been recently identified by gene cloning, immunoblotting and immunocytochemical techniques (Erlander and Tobin, 1991; Erlander *et al.*, 1991; Kaufman *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1991).

Chronic intracortical infusion of GABA in the motor cortex of baboons exerts anticonvulsant effects (Brailowsky *et al.*, 1987), but, paradoxically, cessation of chronic infusion of GABA in the motor cortex of these animals, as well as in non-epileptic baboons and in intact rats, results in long-lasting epileptic EEG discharges. This has been established as a model of focal epilepsy, termed "GABA-withdrawal syndrome" (GWS) (Brailowsky *et al.*, 1987, 1988, 1990). The mechanism of production of this syndrome is not known, but two obvious possibilities are desensitization of GABA receptors and decrease in GABA synthesis (Silva-Barrat *et al.*, 1989). The aim of the present work was to study the latter possibility, and for this purpose we have measured the activity of GAD, as well as the concentration of GABA and other amino acids, in the motor cortex of rats infused with GABA for variable time periods, under three

* To whom all correspondence should be addressed.

experimental conditions: prior to, during and after the occurrence of GWS epileptic discharges.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

GABA infusion

Male Wistar rats, weighing approx. 250 g, were used throughout. Under halothane anaesthesia animals were stereotactically implanted bilaterally with a cannula-electrode (0.6 mm external diameter) in the motor cortex (stereotaxic coordinates were: P 2.0, L 2.0, D 1.5, using bregma as the reference point; Paxinos and Watson, 1986). With these coordinates, the tip of the cannula penetrated to nearly half the thickness of the cortex (layers IV-V). After 1 week for recovery, GABA infusion was carried out in the awake animals by one of two procedures. For 24 h infusion, an Alzet osmotic pump (model 2001, 1 μ l/h), was subcutaneously implanted in the back of the neck, whereas for 2 and 6 h infusion a programmable Harvard pump was used. In both procedures the rate of infusion was 50 μ g GABA/ μ l/h (Silva-Barrat *et al.*, 1989). GABA was dissolved in isotonic saline containing 1 mg/ml of the dye Direct blue 15, in order to ascertain the correct site of infusion and the functioning of the pumps. The pH of the solution was 7.1. Rats in which the dye was not detected were discarded. EEG recording (bipolar, 1-300 Hz) was started 30 min before the cessation of the infusion and continued until the appearance of epileptic activity. For the group post-GWS (see below) an EEG was recorded daily for 30-60 min. Several control experiments showed that neither sham operations in which the cannula was implanted but no GABA was infused, nor infusion with saline containing only Direct blue, affected any of the parameters studied.

As shown in Table 1, each group of rats (2, 6 and 24 h GABA infusion) was divided in two subgroups. Subgroup Pre-GWS: rats were killed by decapitation immediately after cessation of infusion, before the appearance of EEG discharges. Subgroup GWS: rats were killed 60 min after the appearance of EEG paroxysmal discharges. In addition, rats infused with GABA for 2 h were divided in two subgroups: the first one was sacrificed during GWS, but at 5 days after its appearance, using animals in which by that time the syndrome was still evident; rats of the second one (subgroup Post-GWS) were killed at one of three different times after the EEG signs of epileptic activity had disappeared (see Table 1 and Results).

GAD and amino acids assay

Immediately after decapitation, the cerebral cortex was dissected out on ice and small fragments were punched out with a 2 mm internal diameter pipette tip. Since the actual spread of GABA is difficult to know, the Direct blue-stained area was taken as the GABA-infused motor cortex. For use as controls, punches were taken from the corresponding contralateral motor cortex and the occipital cortex of the two hemispheres. The corresponding punches from the cortex of intact rats were also used as further control tissue. GAD activity determinations were carried out in parallel in all punches.

GAD activity was measured in water or 50 mM phosphate buffer homogenates (4:1 v/w) by the microisotopic procedure of Albers and Brady (1959), modified as previously described

in detail (Tapia and Salazar, 1991), in the absence and in the presence of 0.5 mM PLP.

The levels of GABA, glutamate, aspartate, glycine, alanine and taurine were measured by HPLC in extracts of the homogenates of the punches described above. An aliquot was taken for protein determination and perchloric acid (0.6% final concentration) was added to the homogenates. Protein was sedimented in a microfuge and the supernatant was neutralized with KOH and centrifuged again to sediment the precipitated potassium perchlorate. Amino acids were derivatized with O-phthalaldehyde and after 3 min 20 μ l were injected in a Beckman liquid chromatograph. The HPLC procedure was essentially as described by Geddes and Wood (1984), using a reverse phase ODS column (25 cm \times 4 mm) and a linear gradient (from 25% to 75% methanol) of a mixture methanol:0.1 mM potassium acetate buffer, pH 5.5. The amino acids were detected fluorometrically and the identification and quantitation of peaks were made by comparison of their retention times with those of standard amino acid mixtures and by adding internal standards.

Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (1951).

Materials

Direct blue 15, O-phthalaldehyde and the standard amino acids were purchased from Sigma (St Louis, MO, U.S.A.), L-[1-¹⁴C]glutamic acid (sp. act. 53 mCi/mmol) from Amersham (Buckinghamshire, U.K.) and the HPLC solvents from Merck (Darmstadt, Germany).

RESULTS

GABA withdrawal syndrome

In the present experiments, the alterations in the electrical activity occurring after discontinuing the 2, 6 or 24 h GABA infusion did not differ importantly from those reported previously (Brailowsky *et al.*, 1988, 1990). The onset of the first epileptic spikes in the infused cortex occurred at (min) 78.6 ± 12.6 , 40.8 ± 13.9 and 41.9 ± 6.6 after cessation of the infusion during 2, 6 and 24 h, respectively (means \pm SEM for the number of GWS animals indicated in Fig. 1). In the rats in which recovery from GWS was allowed, the duration of the epileptic discharges was variable, ranging from 24 h to 3-5 days. As indicated in Table 1, some rats with GWS during 5 days after 2 h GABA infusion were chosen for biochemical studies of long-term syndrome.

GAD activity

The results of GAD activity measurements are shown in Table 2. The activity in the cortex contralateral to the infused side did not differ significantly from that in the cortex of intact control rats. In the latter group the values were 7.59 ± 0.5 and 19.3 ± 0.5 μ mol/100 mg protein/h ($n = 27$) in the absence and in presence of PLP, respectively, whereas those in the contralateral cortex of the different groups ranged

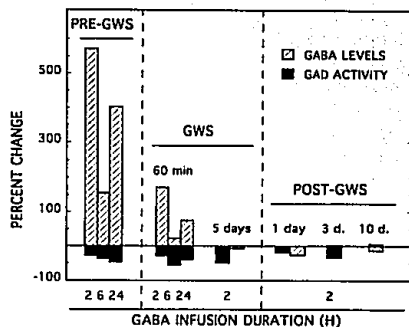


Fig. 1. Percent changes in GABA levels and GAD activity in the GABA-infused cortex, as compared to the contralateral cortex. The duration of GABA infusion is indicated below each bar or group of bars and the time of sacrifice before (PRE-GWS = zero time), during (GWS) and after (POST-GWS) EEG discharges is shown above the bars (see Table 1). Calculated from Tables 2 and 3.

Table 1. Groups of animals and experimental protocol

Groups	GABA infusion duration (h)	Time of sacrifice
Control intact rats	0	In parallel with infused rats
Pre-GWS	2 6 24	Zero time after cessation of GABA infusion
GWS	2 6 24	60 min or 5 days after the appearance of EEG discharges 60 min after the appearance of EEG discharges
Post-GWS	2	1, 3 or 10 days after the cessation of EEG epileptic activity

Table 2. GAD activity in GABA-infused cortex and in contralateral cortex, in the presence of added PLP

GABA infusion time (h)	Cortex	Pre-GWS	GWS		Post-GWS		
			60 min	5 days	1 day	3 days	10 days
2	Treated	12.7 ± 1.3* (8)	12.7 ± 1.4* (8)	8.99 ± 1.0* (9)	14.5 ± 1.2 (6)	11.3 ± 1.0* (7)	17.1 ± 3.2 (3)
	Contralateral	17.5 ± 1.4 (7)	17.5 ± 0.8 (8)	17.8 ± 1.2 (9)	17.7 ± 1.5 (6)	17.2 ± 1.9 (4)	16.3 ± 1.8 (3)
6	Treated	13.0 ± 0.8† (7)	9.67 ± 1.2† (7)	—	—	—	—
	Contralateral	20.4 ± 1.2 (7)	21.6 ± 2.2 (7)	—	—	—	—
24	Treated	10.7 ± 1.3† (8)	9.79 ± 1.0† (9)	—	—	—	—
	Contralateral	20.5 ± 1.4 (9)	16.0 ± 0.7 (9)	—	—	—	—

The figures are $\mu\text{mol}/100 \text{ mg protein/h}$. Mean values \pm SEM for the number of animals shown in parentheses.

* $P < 0.05$; † $P < 0.01$ vs the corresponding contralateral value (ANOVA test). Similar significances were observed vs the intact rat control value.

from 6.16 ± 0.7 to $9.8 \pm 0.9 \mu\text{mol}/100 \text{ mg protein/h}$ in the absence of PLP and from 16.0 ± 0.7 to 20.7 ± 2.5 in the presence of the cofactor ($n = 6-9$) (the latter two limit values are from Table 2).

As mentioned in Experimental Procedures, GAD activity in the occipital cortex of both hemispheres was also measured in each group of rats. No significant differences were found in the enzyme activity, neither in the ipsilateral nor in the contralateral occipital cortices, as compared to the control or the contralateral motor cortices (data not shown).

In view of the above, it seems adequate to express the changes observed in the GABA-infused cortex as percent of the contralateral cortex in the same group of rats. As can be seen in Table 2 and Fig. 1, when measured in the presence of saturating PLP concentration (holoenzyme), the chronic infusion of GABA in the motor cortex resulted in a significant decrease in GAD activity in all groups of rats. In the pre-GWS groups, that is, at zero time after the end of the GABA infusion period and before the development of EEG seizures, GAD activity was decreased by 28% when the infusion period was 2 h, and this percentage augmented to 37% and 48% when the infusion period was 6 and 24 h, respectively. When GAD activity was determined at 60 min after the initiation of seizures (60 min GWS group), the percent decrease was 41%, 55% and 39% in the groups infused during 2, 6 and 24 h, respectively, suggesting that at this time the GABA infusion period was not an important factor in the quantitative diminution of the enzyme. Therefore, only rats infused for 2 h were studied at longer time periods. In these animals showing GWS for 5 days, the enzyme was still decreased by 50%, and it was only after one or ten days after

cessation of the GWS (Post-GWS) that it returned to values close to normal (although in the 3 day-subgroup a significant inhibition was still observed) (Table 2, Fig. 1).

When GAD was measured in the absence of exogenous PLP, percent decreases of its activity similar to those in the presence of the cofactor were observed. However, the results were more variable, due probably to the comparatively low GAD activity when no PLP was added (results not shown).

GABA levels

The concentration of GABA in the cortex of intact rats was 26.6 ± 2.1 nmol/mg protein ($n = 26$), whereas in the cortex contralateral to the infused side it varied from 15.7 ± 2.2 to 38.4 ± 5.0 nmol/mg protein (Table 3). As shown in Table 3 and Fig. 1, the concentration of GABA in the infused cortex was increased 3–6-fold immediately after stopping the infusion (zero time, pre-GWS), independently of the infusion duration. However, in contrast to the changes in GAD, GABA levels had decreased considerably (to less than twice the control) after 60 min of GWS and at 5 days or in the post-GWS period they had returned to normal values (Fig. 1). No significant changes were observed in the concentration of the other amino acids measured, in any of the experimental conditions tested (not shown).

DISCUSSION

The main finding of the present work is that the activity of GAD in the motor cortex is decreased after the infusion of GABA *in vivo*, and that this decrement is already present immediately after the end of the infusion, prior to the occurrence of EEG seizures. This

fact, which occurred independently of the duration of the infusion period, indicates that the diminution of GAD activity is not a consequence of seizure activity and suggests, but does not prove, that a decreased rate of GABA synthesis may be a critical factor in the pathophysiology of GWS. At this pre-GWS time the concentration of GABA was increased several fold, suggesting a product-inhibition of the enzyme. However, during seizure discharges GABA levels had returned to normal values but GAD activity was still as diminished as at the pre-GWS period. Therefore, the possibility that the excess GABA in the tissue is affecting the activity of the enzyme during its *in vitro* measurement (Porter and Martin, 1984; Sze and Lovell, 1970; Tunnicliff and Ngo, 1986) can be discarded. As discussed below, a more plausible explanation is that the synthesis of the GAD protein is being decreased by the temporary excess of GABA.

It is surprising that the high concentration of GABA attained immediately after the infusion returned to nearly normal values in only about 1 h. Since GABA must be taken up before it can be metabolized by GABA transaminase, this indicates that both the GABA carrier and the transaminase are functioning efficiently. It is therefore possible that the decreased GAD activity is due to intracellular GABA rather than to an interaction of the amino acid with the neuronal membrane. In agreement with this conclusion, it has been recently shown, both in rat cortical neuronal cultures (Rimvall and Martin, 1992) and in cerebral cortex *in vivo* (Rimvall *et al.*, 1993), that an increase in intracellular GABA, produced by long duration exposure to the GABA-transaminase inhibitor γ -vinyl-GABA, also results in a decrease of GAD activity. The effects on cultured cortical neurons do not seem to involve GABA receptors, since neither

Table 3. GABA levels in GABA-infused cortex and in contralateral cortex

GABA infusion duration (h)	Cortex	Pre-GWS	GWS		Post-GWS		
			60 min	5 days	1 day	3 days	10 days
2	Treated	$214.3 \pm 63.6^*$ (6)	$42.6 \pm 11.2^*$ (8)	29.1 ± 6.7 (5)	26.8 ± 1.2 (3)	33.1 ± 4.4 (7)	23.2 ± 3.0 (3)
	Contralat.	31.8 ± 8.2 (6)	15.7 ± 2.2 (8)	31.2 ± 6.5 (5)	35.6 ± 1.6 (3)	32.2 ± 5.2 (6)	26.6 ± 2.4 (3)
6	Treated	$98.6 \pm 22.6^*$ (7)	23.7 ± 4.2 (7)	—	—	—	—
	Contralat.	38.4 ± 5.0 (7)	19.4 ± 2.1 (6)	—	—	—	—
24	Treated	$110.8 \pm 16.2^*$ (8)	42.5 ± 6.0 (9)	—	—	—	—
	Contralat.	22.0 ± 2.6 (9)	24.3 ± 3.3 (8)	—	—	—	—

The figures are nmol/mg protein. Mean values \pm SEM for the number of animals shown in parentheses.

* $P < 0.05$ vs the corresponding contralateral value (ANOVA test). Similar significances were observed vs the intact rat control value.

muscimol nor baclofen affected GAD activity, although in cultured chick retinal neurons it has been shown that relatively long incubations with high GABA concentrations result in a notable decrease of both GAD activity and GAD immunostaining, and that this decrease can be prevented by blocking of the Cl⁻ channel associated to the GABA_A receptor with picrotoxin (De Mello, 1984; De Mello *et al.*, 1991).

From the above discussion, it is possible to postulate that the decline of GAD activity observed in the GABA-infused cortex is due to a decreased rate of synthesis of the GAD protein. Although we have not measured the amount of the enzyme, the fact that its activity was notably decreased for many hours, and even days, after GABA levels had returned to normal, both in the absence and in the presence of saturating PLP concentrations, strongly suggests that this is the case. This also indicates that probably no alterations in the availability of the coenzyme occurred. In this respect, a decrease of GAD activity, measured in the presence of saturating PLP concentrations, has been reported after elevation of GABA levels *in vivo* by chronic γ -vinyl-GABA administration (Neal and Shah, 1990; Perry *et al.*, 1979). In addition, immunoblotting studies have shown that, both in neuronal cultures (Rimvall and Martin, 1992) and *in vivo* (Rimvall *et al.*, 1993), an increase of GABA concentration produced by chronic exposure to γ -vinyl-GABA results in a marked decrease of GAD₆₇ protein, the larger and free-PLP-independent form of the rat enzyme that has been cloned (Kaufman *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1991). The diminution of GAD₆₇ observed *in vivo* was not accompanied by a decrease of its mRNA (Rimvall *et al.*, 1993).

As already mentioned, the fact that GAD activity was considerably decreased immediately after cessation of GABA infusion, prior to the appearance of EEG seizures, suggests that a decrease in the rate of GABA synthesis is involved in convulsive activity. Previous findings indicate that a decrease in the synthesis of GABA by inhibition of GAD activity, in spite of remarkable increases in intracellular GABA, results in convulsion (Tapia, 1975, 1980; Tapia *et al.*, 1975; Wood *et al.*, 1980). The delay in the appearance of seizures can be attributed to the fact that a certain proportion of the large amount of GABA present in the tissue is probably in the extracellular space and therefore is capable of interacting with the postsynaptic GABA_A receptors.

The possibility that a desensitization of GABA receptors, due to the continuous exposure to high GABA concentration, may also play a role in the production of seizures, cannot be discarded. In sup-

port of this possibility, it has been reported that in cortex slices obtained from rats with GWS produced after 5–7 days of GABA infusion there is a sub-sensitivity of the intrinsically bursting neurons to GABA and isoguvacine (Silva-Barrat *et al.*, 1989).

In conclusion, the long lasting decrease in GAD activity observed after chronic infusion of GABA into the motor cortex seems to be due to a diminished rate in the synthesis of the enzyme. This indicates that the intracellular concentration of GABA may be a regulatory factor of GAD synthesis *in vivo*. The temporal correlation between the return of GABA levels to normal values, the persistence of diminished GAD activity and the occurrence of EEG seizures, after cessation of the infusion, suggests that a decreased GABA synthesis may be involved in the epileptic GWS.

Acknowledgements—The participation of Vincent Leveil (C.N.R.S., Gif sur Yvette, France) in the initial stages of this project is gratefully acknowledged. This work was supported by DGAPA, UNAM (Project IN201089) and by Conacyt (Mexico).

REFERENCES

- Albers R. W. and Brady R. D. (1959) The distribution of glutamic acid decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* **234**, 926–928.
- Arias C., Valero H. and Tapia R. (1992) Inhibition of brain glutamate decarboxylase is related to febrile seizures in rat pups. *J. Neurochem.* **58**, 369–373.
- Bayón A., Possani L. D., Tapia M. and 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.
- Brailowsky S., Menini C., Silva-Barrat C. and Naquet R. (1987) Epileptogenic gamma-aminobutyric acid withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons. *Neurosci. Lett.* **74**, 75–80.
- Brailowsky S., Kunimoto M., Menini C., Silva-Barrat C., Riche D. and Naquet R. (1988) The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain Res.* **442**, 175–179.
- Brailowsky S., Kunimoto M., Silva-Barrat C., Menini C. and Naquet R. (1990) An electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in the rat. *Epilepsia* **31**, 369–377.
- Covarrubias M. and 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.
- De Mello F. G. (1984) GABA-mediated control of glutamate decarboxylase (GAD) in cell aggregate culture of chick embryo retina. *Dev. Brain Res.* **14**, 7–13.
- De Mello F. G., Hokoç J. N., Ventura A. L. M. and Gardino P. F. (1991) Glutamic acid decarboxylase of embryonic avian retina cells in culture: regulation by γ -aminobutyric acid (GABA). *Cell. molec. Neurobiol.* **11**, 485–496.

- Erlander M. G. and Tobin A. J. (1991) The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem. Res.* 16, 215-226.
- Erlander M. G., Tillakaratne N. J. K., Feldblum S., Patel N. and Tobin A. J. (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7, 91-100.
- Geddes J. W. and Wood J. D. (1984) Changes in the amino acid content of nerve endings (synaptosomes) induced by drugs that alter the metabolism of glutamate and γ -aminobutyric acid. *J. Neurochem.* 42, 16-24.
- Kaufman D. L., Houser C. R. and Tobin A. J. (1991) Two forms of the γ -aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J. Neurochem.* 56, 720-723.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Martin D. L., Martin S. B., Wu S. J. and Espina N. (1991) Regulatory properties of brain glutamate decarboxylase (GAD): the apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. *J. Neurosci.* 11, 2725-2731.
- Meldrum B. S. (1975) Epilepsy and γ -aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int. Rev. Neurobiol.* 17, 1-36.
- Neal M. J. and Shah M. A. (1990) Development of tolerance to the effects of vigabatrin (γ -vinyl-GABA) on GABA release from rat cerebral cortex, spinal cord and retina. *Br. J. Pharmacol.* 100, 324-328.
- Paxinos G. and Watson C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney.
- Perry T. L., Kish S. J. and Hansen S. (1979) γ -VinylGABA: effects of chronic administration on the metabolism of GABA and other amino compounds in rat brain. *J. Neurochem.* 32, 1641-1645.
- Porter T. G. and Martin D. L. (1984) Evidence for feedback regulation of glutamate decarboxylase by γ -aminobutyric acid. *J. Neurochem.* 43, 1464-1467.
- Rimvall K. and Martin D. L. (1992) Increased intracellular γ -aminobutyric acid selectively lowers the level of the larger of two glutamate decarboxylase proteins in cultured GABAergic neurons from rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 58, 158-166.
- Rimvall K., Sheikh S. N. and Martin D. L. (1993) Effects of increased γ -aminobutyric acid levels on GAD₆₇ protein and mRNA levels in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 60, 714-720.
- Silva-Barrat C., Champagnat J., Brailowsky S., Menini C. and Naquet R. (1989) Relationship between tolerance to GABA_A agonist and bursting properties in neocortical neurons during GABA-withdrawal syndrome. *Brain Res.* 498, 289-298.
- Sze P. Y. and Lovell R. A. (1970) Reduction of level of L-glutamic acid decarboxylase by γ -aminobutyric acid in mouse brain. *J. Neurochem.* 17, 1657-1664.
- Tapia R. (1975) Biochemical pharmacology of GABA in CNS. In: *Handbook of Psychopharmacology* (Iversen L. L., Iversen S. D. and Snyder S. H., eds), Vol. 4, pp. 1-58. Plenum, New York.
- Tapia R. (1976) Evidence for a synthesis-dependent release of GABA. In: *Transport Phenomena in the Nervous System: Physiological and Pathological Aspects* (Levi G., Battistin L. and Lajtha A., eds), pp. 385-394. Plenum, New York.
- Tapia R. (1980) Convulsions and the function of GABAergic synapses. In: *Neurochemistry and Clinical Neurology* (Battistin L., Hashim G. and Lajtha A., eds), pp. 123-131. Alan R. Liss, New York.
- Tapia R. (1983) Regulation of glutamate decarboxylase activity. In: *Glutamate, Glutamine and GABA in the Central Nervous System* (Hertz L., Kvamme E., McGeer E. G. and Schoushoe A., eds), pp. 113-128. Alan R. Liss, New York.
- Tapia R. and Sandoval M. E. (1971) Study on the inhibition of brain glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate-oxime-O-acetic acid. *J. Neurochem.* 18, 2051-2059.
- Tapia R. and Salazar P. (1991) Glutamate decarboxylase activity in the substantia nigra and the hippocampus of rats microinjected with inhibitors of the enzyme. *Neurochem. Res.* 16, 263-267.
- Tapia R., Sandoval M. E. and Contreras P. (1975) Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. *J. Neurochem.* 24, 1283-1285.
- Tunnicliff G. and Ngo T. T. (1986) Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in the vertebrate nervous system. *Neurochem. Int.* 8, 287-297.
- Wood J. D., Russell M. P. and Kurylo E. (1980) The γ -aminobutyrate content of nerve endings (synaptosomes) in mice after the intramuscular injection of γ -aminobutyrate-elevating agents: a possible role in anticonvulsant activity. *J. Neurochem.* 35, 125-130.

V RESULTADOS ADICIONALES

REGISTRO ELECTROCORTICOGRAFICO:

Los registros del EEG mostraron una actividad eléctrica basal muy semejante en los animales infundidos con salina en la corteza motora, que en los no infundidos (intactos o lesionados). La interrupción del tratamiento produjo descargas epilépticas focales que se iniciaron en la corteza motora infundida (CM). Las descargas epilépticas se caracterizan por ser despolarizaciones de gran amplitud y sincrónicas, que están asociadas con trenes de potenciales de acción de alta frecuencia. Estas descargas posteriormente se propagaron a la corteza motora contralateral (CCM) que no recibió GABA. En esta corteza la amplitud de las descargas es menor. La latencia de aparición de la primera descarga paroxística durante el SAG en la corteza motora infundida, fué de 78.6 ± 12.6 min (n=8) para los animales tratados durante 2 h, 40.8 ± 13.9 min (n=7) para aquellos infundidos 6 h, y 41.9 ± 6.6 min (n=10) para los de 24 h. La corteza occipital no mostró descargas epilépticas.

En la figura 6 se muestra un ejemplo del registro en diferentes momentos de la actividad eléctrica de un animal infundido durante 2 h. Primero se observa que durante la perfusión del GABA (30 minutos antes de la interrupción de la infusión, Pre-SAG), el animal presentó una actividad eléctrica basal, tanto en la CM como en la CCM. El tiempo que ocurrió entre la interrupción del tratamiento y la aparición de la primera espiga paroxística focal,

SAG (GABA 2h)

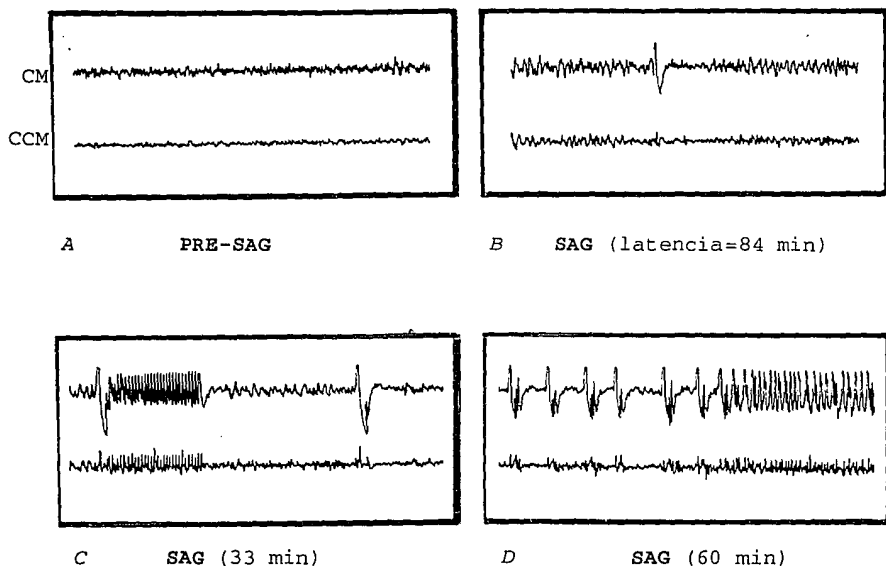


Figura 6. Registro electroencefalográfico de un animal con SAG, inducido por el cese de un tratamiento con GABA durante 2 h.

El animal se infundió con GABA 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{h}$ durante 2 h, a través de una cánula-electrodo previamente implantada estereotácticamente. El animal comenzó a registrarse durante los últimos 30 minutos de la infusión (Pre-SAG). Una vez que apareció la primera descarga epiléptica, en este caso a los 84 minutos posteriores al cese del tratamiento, se continuó durante una hora más. A: Registro de la actividad eléctrica basal. B: Espiga epiléptica que marca el inicio del SAG (latencia=84 min, desde la interrupción de la infusión hasta la aparición de la primera espiga del SAG). C: 33 min y D: 60 min posteriores a la primera espiga durante el SAG. Abreviaturas : CM, corteza motora infundida con GABA; y CCM, corteza motora contralateral al sitio de infusión.

en este caso fué de 84 minutos. El registro se continuó durante 60 minutos a partir de esta primera espiga. En la figura se presenta el desarrollo del SAG a los 33 y a los 60 minutos. Posteriormente este animal se sacrificó para la determinación de la actividad de la GAD.

La recuperación del SAG se determinó registrando a los animales diariamente durante 1 hora. El registro mostró que las descargas epilépticas comienzan a disminuir y a presentarse únicamente durante el sueño. En estos animales se determinó la actividad de la GAD el día 1, 3 o 10 posteriores a la desaparición total de la epilepsia, independientemente del tiempo de duración del SAG. El SAG duró desde uno hasta varios días.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD *ex vivo*:

El análisis enzimático en animales no infundidos (control) mostró que la actividad de la GAD en la corteza motora (CM) fué de 7.59 ± 0.5 y 19.3 ± 0.5 $\mu\text{mol}/100 \text{ mg proteína/h}$ ($n=27$), en ausencia y en presencia de PLP añadido *in vitro*, respectivamente. La actividad de la enzima en las cortezas contralateral motora así como la occipital ipsi o contralateral al sitio infundido, no difiere significativamente de la de los animales control intactos. La corteza contralateral de estos animales tiene valores de 19.4 ± 0.2 y 8.5 ± 0.5 en presencia y en ausencia del cofactor, respectivamente. Los valores en las cortezas occipital ipsi o contralateral al sitio de infusión, no muestran tampoco diferencia con estos valores, siendo de 19.7 ± 1.0 y de 19.1 ± 0.7 en la CO

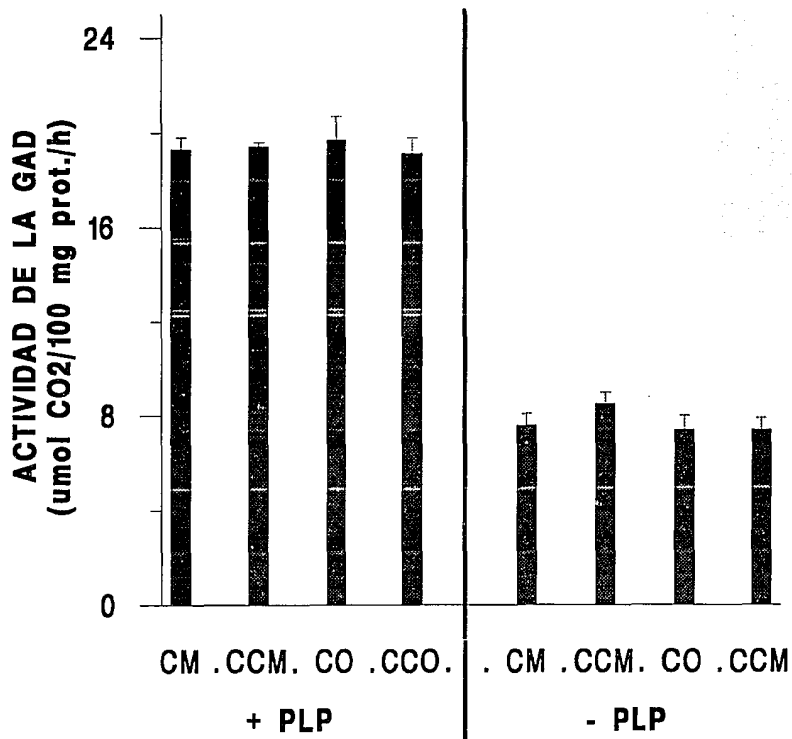
y CCO en presencia de PLP, respectivamente, y de 7.4 ± 0.6 y 7.4 ± 0.5 sin PLP (Figura 7). Los valores obtenidos en todas las cortezas son muy semejantes, por lo cual, los resultados siguientes se reportarán comparando contra el sitio contralateral a la infusión. La interrupción de la infusión de GABA, administrado durante 2, 6 o 24 horas, produjo una inhibición en la actividad de la GAD, tanto en presencia como en ausencia de PLP, en el sitio de infusión de todos los animales tratados.

Los animales infundidos sacrificados inmediatamente después de la administración del GABA en la corteza motora, durante 2, 6 o 24 horas (PRE-SAG), mostraron que la actividad de la GAD, en la corteza motora tratada en presencia de PLP añadido *in vitro*, ya se encontraba disminuida en este tiempo, alcanzando un porcentaje de inhibición de 28%, 37% o 48%, respectivamente a los diferentes tiempos de infusión, respecto al lado contralateral correspondiente (control). Es importante notar que este decremento se presentó aún cuando todavía no aparecía el SAG (Ver artículo anexo).

La actividad de la enzima en presencia del cofactor, continuó por debajo del control una vez que el animal ya tenía la epilepsia. Esta se determinó en los animales infundidos durante los diferentes tiempos antes mencionados y sacrificados 1 hora después de la aparición de la primera descarga paroxística (SAG). La actividad disminuyó 41%, 55% o 39%, respectivamente, y además en animales epilépticos sacrificados cinco días posteriores al inicio del SAG, la actividad de la enzima se inhibió un 50% (Ver artículo anexo).

Figura 7. Actividad de la GAD en animales control.

Se utilizaron porciones corticales del área motora de cada uno de los hemisferios cerebrales, de animales que no recibieron ningún tratamiento (control). La actividad de la enzima, tanto en presencia como en ausencia de PLP, se determinó mediante la cuantificación del CO₂ liberado durante la reacción de síntesis de GABA, al utilizar como sustrato el ácido glutámico marcado radioactivamente. Los resultados se expresan en $\mu\text{mol CO}_2/100 \text{ mg proteína/h}$. En cada barra se indica el E.E. (N = 27).



Los animales con SAG recuperaron sus valores basales en la actividad enzimática, después de algunos días de haber terminado las descargas epilépticas (POST-SAG).

Todos los valores numéricos para estas condiciones se presentan en el artículo anexo.

En la tabla 1 se muestra la actividad de la enzima sin el cofactor en estos mismos animales, que mostró aproximadamente el mismo decremento porcentual que en presencia de PLP, comparando los valores obtenidos contra el lado contralateral al sitio infundido. Previo a la aparición del SAG, en los animales infundidos durante 2, 6 o 24 horas, la inhibición de la actividad de la enzima fué de 28%, 33% y 48% respectivamente. Durante el síndrome este decremento tiende a mantenerse. En el Post-SAG, se observa la recuperación total de la enzima hasta el día 10 posterior a la desaparición de las espigas epilépticas en el EEG.

La actividad de la enzima tanto en presencia (Tabla 2), como en ausencia de PLP (Tabla 3), en la corteza occipital, no mostró ser diferente de la corteza occipital contralateral en ninguna de las condiciones experimentales. Los valores son muy semejantes a los obtenidos en animales control que no recibieron GABA graficados en la figura 7.

Aún cuando los resultados de la actividad enzimática, determinada en ausencia del cofactor, en las diferentes condiciones, son muy variables, los cambios obtenidos debidos al SAG son muy evidentes en la corteza infundida.

Tabla 1. Actividad de la GAD en la corteza motora tratada y en la corteza motora contralateral a la infusión, en ausencia de PLP.

T inf. (h)	PRE-SAG	SAG		POST-SAG			
		60 min	5 d	1 d	3 d	10 d	
2	CM	4.8±0.4* (8)	6.1±0.7 (8)	4.7±0.5† (9)	7.3±0.7 (6)	5.7±0.4 (7)	8.3±0.4 (3)
	CCM	6.6±0.7 (8)	6.8±0.6 (8)	9.0±0.9 (9)	8.6±1.3 (6)	8.8±0.5 (6)	7.0±0.3 (3)
6	CM	5.2±0.3† (7)	4.5±0.9* (7)	-	-	-	-
	CCM	7.8±0.5 (7)	7.0±0.7 (7)	-	-	-	-
24	CM	5.1±1.2† (8)	4.8±0.5 (9)	-	-	-	-
	CCM	9.8±0.8 (9)	6.1±0.7 (9)	-	-	-	-

Los valores se expresan en $\mu\text{mol}/100 \text{ mg prot/h} \pm \text{E.E.}$ del número de animales indicado en cada paréntesis. De acuerdo a la prueba estadística ANOVA, * $p < 0.05$; † $p < 0.01$, respecto al valor contralateral. Los valores son muy semejantes a los obtenidos en animales no tratados.

Tabla 2. Actividad de la GAD en la corteza occipital tratada y en la corteza occipital contralateral a la infusión, en presencia de PLP.

T inf. (h)	PRE-SAG	SAG		POST-SAG			
		60 min	5 d	1 d	3 d	10 d	
2	CM	17.3±0.4 (8)	17.4±0.4 (8)	20.7±1.5† (9)	17.6±0.7 (6)	20.2±2.7 (7)	15.2 (2)
	CCM	17.9±1.3 (8)	17.3±0.2 (7)	20.6±1.0 (9)	19.3±1.2 (6)	20.9±2.0 (7)	17.9±0.8 (3)
6	CM	21.7±1.0 (6)	19.5±1.2 (7)	-	-	-	-
	CCM	22.2±0.7 (7)	20.8±1.5 (7)	-	-	-	-
24	CM	20.2±0.8 (9)	20.5±1.1 (10)	-	-	-	-
	CCM	20.6±0.9 (9)	18.7±0.7 (10)	-	-	-	-

Los valores se expresan en $\mu\text{mol}/100 \text{ mg prot/h} \pm \text{E.E.}$ del número de animales indicado en cada paréntesis. De acuerdo a la prueba estadística ANOVA ($p < 0.05$) los resultados no fueron significativos respecto al valor contralateral. Los valores son muy semejantes a los obtenidos en animales no tratados.

Tabla 3. Actividad de la GAD en la corteza occipital tratada y en la corteza occipital contralateral a la infusión, en ausencia de PLP.

T inf. (h)	PRE-SAG	SAG		POST-SAG		
		60 min	5 d	1 d	3 d	10 d
2 CM	7.7±1.0 (8)	7.1±0.7 (8)	9.1±0.9 (9)	8.1±0.9 (6)	10.2±1.6 (7)	6.0±0.8 (3)
CCM	7.9±1.4 (8)	6.8±0.7 (7)	9.3±0.7 (9)	8.5±0.4 (6)	11.0±1.3 (7)	5.7±0.8 (3)
6 CM	8.9±1.1 (7)	6.6±0.5 (7)	-	-	-	-
CCM	8.0±0.5 (7)	6.0±0.5 (7)	-	-	-	-
24 CM	8.7±1.2 (9)	8.1±1.0 (9)	-	-	-	-
CCM	9.7±0.8 (9)	8.3±0.8 (10)	-	-	-	-

Los valores se expresan en $\mu\text{mol}/100 \text{ mg prot/h} \pm \text{E.E.}$ del número de animales indicado en cada paréntesis. La prueba estadística ANOVA ($p < 0.05$) no mostró valores significativos respecto al valor contralateral. Los valores son muy semejantes a los obtenidos en animales no tratados.

DETERMINACION DE LOS NIVELES DE AMINOACIDOS:

Utilizando el mismo homogenado cortical que en los experimentos antes mencionados, y en las mismas condiciones experimentales, se analizaron los niveles de los aminoácidos más importantes en el cerebro. Los aminoácidos determinados fueron: el GABA, el ácido aspártico, el ácido glutámico, la glicina, la taurina y la alanina. Los resultados obtenidos no presentaron alteraciones importantes en ninguno de los aminoácidos cuantificados, excepto para el GABA.

Los animales infundidos con GABA durante 2 horas y sacrificados inmediatamente después (Pre-SAG), son los que presentaron los niveles más elevados del GABA en el sitio infundido (Tabla 4. Ver además, el artículo anexo). El incremento obtenido fué de 8 veces por encima de los valores obtenidos en animales intactos (control), y de 3 ó 4 veces en los animales infundidos durante 6 y 24 horas, respectivamente. Durante el SAG, la concentración del GABA regresa a su nivel basal, y las determinaciones posteriores, hasta la desaparición de la epilepsia, no modifican este valor. En la corteza contralateral motora, así como en la occipital, ipsi o contralateral a la infusión, presentan valores que se consideran basales aún cuando varían desde 15.7 ± 2.2 hasta 44.4 ± 5.4 , en todas las condiciones determinadas. Los valores numéricos para cada aminoácido se muestran en las tablas 5-9.

Tabla 4. Niveles de GABA en la corteza motora (CM) y occipital (CO) e ipsi y contralaterales al sitio de infusión, determinados previamente (PRE-SAG), durante (SAG), o posteriormente a la epilepsia registrada en el EEG.

t	INF	PRE-SAG			SAG			POST-SAG		
		60 MIN	5 d	1 d	3 d	10 d				
2	CM	214.3±58.0* (6)	29.1±6.0 (5)	22.4±3.9 (4)	33.1±4.1 (7)	23.1±2.5 (3)				
	CCM	31.8±7.5 (6)	31.2±5.8 (5)	44.4±5.4 (5)	32.2±4.7 (6)	26.2±1.9 (3)				
6	CM	98.6±20.9* (7)	23.7±3.9 (7)							
	CCM	38.4±4.7 (7)	19.4±1.9 (6)							
24	CM	110.8±15.1* (10)	42.5±5.6 (9)							
	CCM	22.0±2.4 (9)	24.3±3.1 (8)							
2	CO	29.9±6.5 (6)	25.6±8.4 (9)							
	CCO	20.9±4.8 (5)	26.4±7.8 (9)							
6	CO	26.5±1.9 (7)	25.5±5.9 (8)							
	CCO	22.6±2.3 (7)	23.5±4.5 (8)							
24	CO	19.5±2.9 (10)	23.8±2.1 (9)							
	CCO	17.7±1.5 (10)	29.8±11.1 (9)							

Los animales infundidos durante 2, 6 o 24 h (t.inf), se sacrificaron a las 0 h después del tratamiento (PRE-SAG), 1 h ó 5 días durante el SAG, y 1, 3 ó 10 días después de la desaparición del SAG (POST-SAG). El valor promedio del número de experimentos denotado en cada paréntesis, se expresa en nmol/ mg prot. ± E.E. ANOVA, p<0.05 respecto al valor contralateral.

Tabla 5. Niveles del ácido aspártico en la corteza motora (CM) y occipital (CO), ipsi y contralaterales al sitio de infusión, determinados previamente (PRE-SAG), durante (SAG), o posteriormente a la epilepsia registrada en el EEG.

t	INF	PRE-SAG			SAG			POST-SAG		
		60 MIN	5 d	1 d	3 d	10 d				
2	CM	67.6±14.3 (5)	31.8± 5.9 (9)	26.6±4.0 (4)	30.1±6.9 (6)	33.4±3.0 (7)	51.1±4.6 (3)			
	CCM	50.0± 8.8 (6)	27.4± 4.5 (9)							
6	CM	27.3± 2.4 (7)	41.6±11.8 (8)							
	CCM	22.9± 2.9 (7)	36.7±12.0 (8)							
24	CM	30.2± 2.9 (10)	48.1± 7.7 (9)							
	CCM	27.4± 2.4 (10)	28.6± 1.6 (9)							
2	CO	42.8± 7.8 (6)	30.5± 3.5 (9)							
	CCO	34.0± 4.5 (5)	28.8± 1.9 (9)							
6	CO	26.5± 0.4 (7)	33.0± 4.2 (8)							
	CCO	30.4± 3.7 (7)	42.7±10.1 (8)							
24	CO	27.4± 2.8 (10)	31.0± 2.1 (9)							
	CCO	30.9± 2.8 (10)	29.5± 1.8 (9)							

Los animales infundidos durante 2, 6 o 24 h (t.inf), se sacrificaron a las 0 h después del tratamiento (PRE-SAG), 1 h ó 5 días durante el SAG, y 1, 3 ó 10 días después de la desaparición del SAG (POST-SAG). El valor promedio del número de experimentos denotado en cada paréntesis, se expresa en nmol/ mg prot. ± E.E. ANOVA, p<0.05 respecto al valor contralateral.

Tabla 6. Niveles de ácido glutámico en la corteza motora (CM) y occipital (CO), ipsi y contralaterales al sitio de infusión, determinados previamente (PRE-SAG), durante (SAG), o posteriormente a la epilepsia registrada en el EEG.

t INF	PRE-SAG		SAG		POST-SAG		
			60 MIN	5 d	1 d	3 d	10 d
2 CM	108.6±29.7 (6)		137.4±14.8 (9)	94.8±23.8 (4)	113.0±24.5 (6)	100.4±8.2 (7)	
CCM	74.9±20.1 (6)		100.0±13.7 (9)				
6 CM	94.5± 7.0 (7)		80.1±17.0 (8)				
CCM	87.7± 9.9 (7)		96.4±32.8 (8)				
24 CM	124.1±15.4 (10)		90.5± 8.3 (9)				
CCM	101.0± 5.3 (8)		54.1±10.6 (9)				
2 CO	76.7±15.2 (6)		122.1± 8.0 (9)				
CCO	103.2±22.5 (4)		117.5± 4.9 (9)				
6 CO	104.5± 7.6 (7)		103.3±25.9 (8)				
CCO	106.8±11.1 (9)		108.6±26.1 (8)				
24 CO	105.6± 9.9 (8)		61.6±12.1 (9)				
CCO	115.2±11.0 (8)		58.9±11.7 (9)				

Los animales infundidos durante 2, 6 o 24 h (t.inf), se sacrificaron a las 0 h después del tratamiento (PRE-SAG), 1 h ó 5 días durante el SAG, y 1,3 ó 10 días después de la desaparición del SAG (POST-SAG). El valor promedio del número de experimentos denotado en cada paréntesis, se expresa en mmol/ mg prot. ± E.E. ANOVA, p<0.05 respecto al valor contralateral.

Tabla 7. Niveles de glicina en la corteza motora (CM) y occipital (CO), ipsi y contralaterales al sitio de infusión, determinados previamente (PRE-SAG), durante (SAG), o posteriormente a la epilepsia registrada en el EEG.

t INF	PRE-SAG		SAG			POST-SAG		
	60 MIN	5 d	1 d	3 d	10 d			
2 CM	95.9±15.4 (6)	123.1±26.8 (9)	74.0±17.4 (6)	136.8±10.8 (7)	144.9±39.0 (3)			
CCM	91.3±16.9 (6)	78.8±18.6 (9)						
6 CM	103.5±7.9 (7)	39.5±9.9 (8)						
CCM	104.5±6.5 (7)	41.6±10.9 (8)						
24 CM	64.7±11.6 (10)	121.6±9.9 (9)						
CCM	61.3±15.4 (10)	74.9±15.5 (9)						
2 CO	87.4±18.7 (6)	82.2±8.6 (9)						
CCO	83.4±14.4 (5)	69.2±7.3 (9)						
6 CO	108.3±4.7 (7)	48.9±14.6 (8)						
CCO	95.8±8.2 (7)	35.0±8.4 (8)						
24 CO	66.9±16.7 (10)	76.7±18.4 (9)						
CCO	67.2±15.1 (10)	67.1±16.6 (9)						

Los animales infundidos durante 2, 6 o 24 h (t.inf), se sacrificaron a las 0 h después del tratamiento (PRE-SAG), 1 h ó 5 días durante el SAG, y 1, 3 ó 10 días después de la desaparición del SAG (POST-SAG). El valor promedio del número de experimentos denotado en cada paréntesis, se expresa en mmol/ mg prot. ± E.E. ANOVA, p<0.05 respecto al valor contralateral.

Tabla 8. Niveles de taurina en la corteza motora (CM) y occipital (CO), ipsi y contralaterales al sitio de infusión, determinados previamente (PRE-SAG), durante (SAG), o posteriormente a la epilepsia registrada en el EEG.

t INF	PRE-SAG		SAG			POST-SAG		
			60 MIN	5 d	1 d	3 d	10 d	
2 CM	45.6 ± 3.7 (6)		52.9 ± 6.0 (9)	40.1 ± 5.2 (3)	38.3 ± 10.7 (3)	55.8 ± 4.5 (7)		
CCM	48.6 ± 6.7 (6)		42.9 ± 6.1 (8)					
6 CM	37.0 ± 1.9 (7)		42.0 ± 5.6 (4)					
CCM	43.3 ± 2.6 (7)		28.2 ± 5.4 (8)					
24 CM	43.0 ± 3.1 (9)		32.1 ± 2.8 (9)					
CCM	43.0 ± 1.9 (9)		27.6 ± 6.3 (9)					
2 CO	47.6 ± 4.9 (6)		48.4 ± 4.3 (9)					
CCO	46.1 ± 7.1 (5)		45.3 ± 4.0 (9)					
6 CO	48.7 ± 2.2 (7)		31.9 ± 5.1 (8)					
CCO	50.6 ± 6.0 (7)		31.7 ± 5.8 (8)					
24 CO	48.1 ± 2.9 (10)		31.2 ± 6.5 (9)					
CCO	47.2 ± 2.3 (10)		25.7 ± 5.2 (9)					

Los animales infundidos durante 2, 6 o 24 h (t.inf), se sacrificaron a las 0 h después del tratamiento (PRE-SAG), 1 h ó 5 días durante el SAG, y 1,3 ó 10 días después de la desaparición del SAG (POST-SAG). El valor promedio del número de experimentos denotado en cada paréntesis, se expresa en nmo./ mg prot. ± E.E. ANOVA, $p < 0.05$ respecto al valor contralateral.

Tabla 9. Niveles de alanina en la corteza motora (CM) y occipital (CO), ipsi y contralaterales al sitio de infusión, determinados previamente (PRE-SAG), durante (SAG), o posteriormente a la epilepsia registrada en el EEG.

t INF	PRE-SAG		SAG			POST-SAG		
	60 MIN	5 d	1 d	3 d	10 d			
2 CM	8.7± 1.3 (6)	10.4± 1.5 (9)	7.7±1.1 (3)	11.1±3.0 (6)	12.1±2.5 (7)	16.3±3.1 (3)		
CCM	6.7± 1.1 (6)	10.5± 1.8 (9)						
6 CM	16.7± 2.1 (7)	9.9± 2.4 (8)						
CCM	9.5± 0.6 (7)	6.7± 1.5 (8)						
24 CM	11.6± 1.1 (10)	12.3± 4.9 (9)						
CCM	8.3± 0.5 (10)	11.0± 0.9 (9)						
2 CO	8.6± 0.9 (6)	9.0± 1.4 (9)						
CCO	7.5± 1.3 (5)	7.1± 0.6 (9)						
6 CO	8.4± 0.5 (7)	7.3± 1.4 (8)						
CCO	8.5± 1.2 (7)	10.5± 0.5 (8)						
24 CO	8.1± 0.7 (10)	8.1± 0.9 (9)						
CCO	7.6± 0.6 (10)	7.9± 1.1 (9)						

Los animales infundidos durante 2, 6 o 24 h (t.inf), se sacrificaron a las 0 h después del tratamiento (PRE-SAG), 1 h ó 5 días durante el SAG, y 1,3 ó 10 días después de la desaparición del SAG (POST-SAG). El valor promedio del número de experimentos denotado en cada paréntesis, se expresa en nmol/ mg prot. ± E.E. ANOVA, p<0.05 respecto al valor contralateral.

ACTIVIDAD DE LA GAD EN EL SAG REPRODUCIDO *in vitro*:

Posteriormente, utilizando rebanadas de corteza y de hipocampo mantenidas en iguales condiciones a las que se han descrito para inducir el SAG *in vitro* (García-Ugalde y col. 1992), se determinó la actividad de la GAD. Para ello, se utilizaron rebanadas que fueron expuestas durante 2 ó 3 horas a un medio fisiológico (MK) ó a un medio en presencia de GABA 5 mM (Tabla 10). Posteriormente, se cambió el medio de incubación del tejido tratado con GABA por un MK fresco, y se analizó la actividad enzimática en dos condiciones: inmediatamente (Pre-SAG), o después de una hora en el MK fresco (SAG), de acuerdo a los tiempos en que aparece el SAG *in vitro* previamente reportado.

La determinación de la actividad de la GAD, tanto en presencia como en ausencia de PLP, en las dos áreas cerebrales consideradas, que estuvieron expuestas crónicamente a MK o al GABA, no mostraron diferencia alguna al comparar los resultados con tejido recién extraído (Control).

En el tejido hipocampal, la actividad de la enzima en el tejido control, en presencia y en ausencia de PLP, fué de 14.1 ± 1.1 y de 5.8 ± 0.5 (n=7), respectivamente. La incubación en MK durante 3 h, no cambió respecto al control, y sus valores fueron de 16.8 ± 0.8 con PLP, y de 5.9 ± 1.2 (n=4) sin PLP.

Dos horas de incubación con GABA no fueron suficientes para alterar la actividad de la GAD. Durante el Pre-SAG, los resultados

Tabla 10. Determinación de la actividad de la GAD en rebanadas de la corteza cerebral y del área CA₁ del hipocampo de la rata, expuestas durante 120 min en presencia de GABA (5 mM).

GABA	FRESCO		TRATAMIENTO					
	0 min				120 min			
MK	0 min		180 min		0 min PRE-SAG		60 min SAG	
PLP	+	-	+	-	+	-	+	-
CA-1	14.1 ±1.1 (7)	5.8 0.5 (7)	16.8 0.8 (4)	5.9 1.2 (4)	14.6 1.1 (6)	4.3 0.4 (6)	14.5 1.7 (7)	4.0 0.4 (7)
Cx	12.9 ±0.8 (7)	6.1 0.9 (6)	13.8 2.2 (5)	5.9 1.6 (5)	12.1 0.4 (5)	4.1 0.6 (5)	12.9 1.3 (6)	4.6 0.4 (6)

El tejido se incubó en MK durante 180 min. o 2 h en GABA, posteriormente se cambió a un medio fisiológico (MK) nuevo y se determinó la actividad de la GAD, tanto en presencia como en ausencia de PLP. En cada experimento se muestra el \pm E.E. En cada dato se denota entre paréntesis el número de animales. Ningún valor fué significativo (ANOVA; $p < 0.05$).

tampoco difieren del control, los valores obtenidos fueron 14.6 ± 1.1 en presencia del cofactor y 4.3 ± 0.4 (n=6) en su ausencia. El SAG no alteró a la enzima, y sus valores fueron 14.5 ± 1.7 (n=7) y 4.0 ± 0.4 (n=7), con y sin PLP.

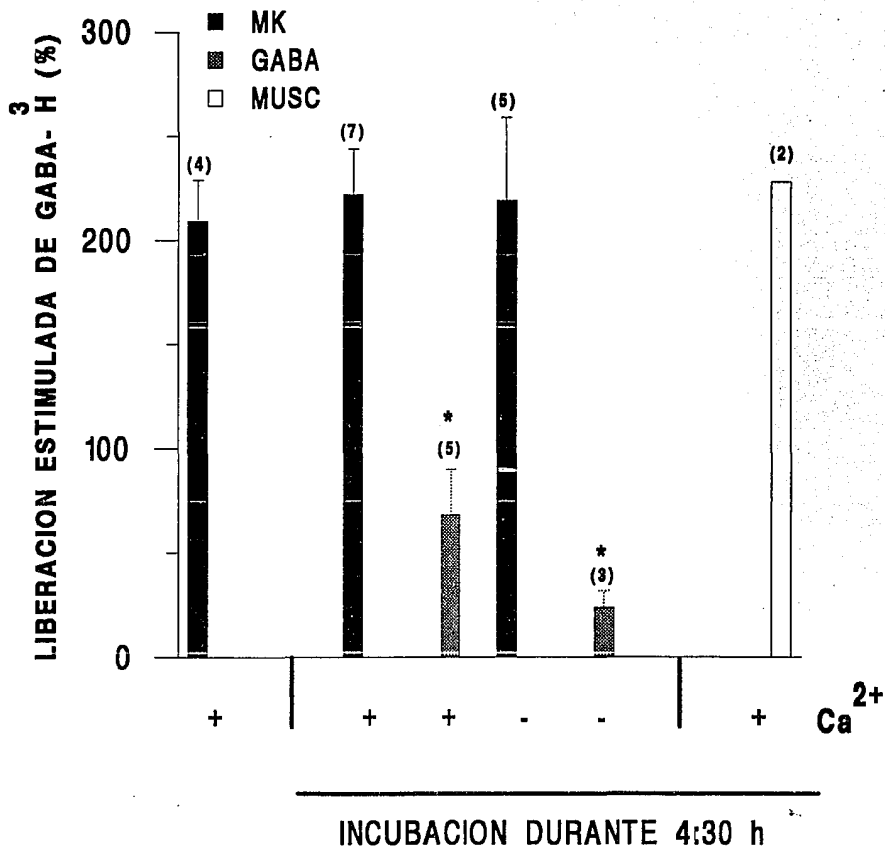
El tejido cortical presenta valores muy semejantes en las diferentes condiciones, a los obtenidos en el hipocampo (Tabla 10).

LIBERACION DE GABA-³H DE REBANADAS CON SAG *in vitro*:

Posteriormente, tratando de observar alguna otra posible alteración en el metabolismo GABAérgico durante el desarrollo del SAG *in vitro*, se estudió la liberación estimulada por despolarización, del GABA marcado radioactivamente mediante una técnica de superfusión continua (Figura 8). Para ello, se determinó la liberación del GABA-³H en rebanadas de corteza incubadas 4.30 h en un MK o en presencia de GABA $100 \mu\text{M}$. Los resultados mostraron que la liberación porcentual de GABA-³H en el tejido recién extraído (control), al despolarizar con altas concentraciones de K⁺ (47 mM), obtuvo un valor de $209 \pm 20\%$ (n=4), respecto a la liberación basal. La exposición prolongada al MK, no modificó la tasa de liberación respecto al control ($222 \pm 22\%$, n=7). En este tejido, el estudio de la dependencia en el calcio durante la perfusión, en presencia de un quelante de este ión, el EGTA ($100 \mu\text{M}$), mostró un valor de $219 \pm 40\%$ (n=5), el cual fué muy semejante, tanto a la condición con calcio en el medio, como al control.

Figura 8. Liberación estimulada de GABA³H en un modelo de SAG *in vitro*.

Se utilizaron rebanadas de corteza motora incubadas durante 4.30 h, en un MK o en presencia de GABA (100 μ M) o muscimol (50 μ M). La liberación de GABA³H se realizó utilizando técnicas de superfusión continua, tanto en presencia, como en ausencia de Ca²⁺ + EGTA (100 μ M), estimulando con elevadas concentraciones de K⁺ (47 mM). Los resultados representan los valores promedio del porcentaje de estimulación del aminoácido radioactivo, respecto a la basal de cada condición \pm E.E. del número de ensayos denotados en cada paréntesis. * p < 0.01 (ANOVA)



El tratamiento crónico con GABA no marcado radioactivamente, disminuyó considerablemente la liberación del aminoácido marcado radioactivamente, presentando un valor de $68 \pm 22\%$ (n=5). En condiciones sin calcio durante la perfusión, ésta se decrementó aún más hasta un $24 \pm 8\%$ (n=3). Las rebanadas mantenidas durante 4.30 h en MK y perfundidas en ausencia de calcio no parecen afectarse, presentando un valor de $219 \pm 40\%$. El tratamiento crónico con un agonista del GABA, el muscimol, no parece afectar la liberación estimulada de GABA³H alcanzando un valor de 228% (n=2).

VI. DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan los trabajos anteriores de *Brailowsky y col.* (1987, 1988, 1990 y 1992), que demostraron que la interrupción de la infusión crónica de GABA *in vivo*, en la corteza motora de la rata, produce descargas epilépticas en el sitio de infusión, y un cuadro convulsivo conocido como "Síndrome de abstinencia al GABA" (SAG) (Figura 6). En el presente trabajo, se analizaron algunos de los mecanismos bioquímicos que podrían participar en la expresión de este síndrome. Los hallazgos más importantes muestran que la interrupción de la infusión exógena de este aminoácido, 1) produce un decremento en la síntesis del GABA endógeno en la corteza motora infundida, debido a una disminución en la actividad de la GAD (artículo anexo), y 2) que tal reducción es previa a la aparición de descargas convulsivas y en tanto que simultáneamente se registra un aumento en los niveles del GABA (Tabla 4 y artículo anexo). Posteriormente la actividad de la GAD se mantiene disminuida y aparece el SAG. Esto sugiere que la inhibición de la síntesis del aminoácido podría ser un factor crítico en el desarrollo y establecimiento de la actividad convulsiva.

Estudios previos apoyan esta hipótesis y demuestran que la disminución en la actividad de la GAD, en condiciones en las que los niveles del GABA endógeno están incrementados, induce epilepsia (*Tapia, 1975; Tapia y col., 1975, 1980; Wood y col., 1980*).

La disminución en la actividad de la GAD determinada en este trabajo, no parece ser consecuencia del SAG, ya que ésta se altera inmediatamente después de la infusión (PRE-SAG, Tabla 1), cuando el síndrome aún no se ha manifestado con las características descargas paroxísticas en el EEG.

La inhibición de la enzima por sustrato se ha observado en distintos sistemas: en experimentos *in vitro*, en GAD purificada del cerebro de ratón (Porter y Martin, 1984), en homogenados del segmento abdominal del nervio ventral del langostino (Grossfeld y col., 1984), y en preparaciones sinaptosomales (Lidén, 1987). Resultados similares se han obtenido *in vivo*, en los cuales el GABA extrasináptico, finalmente es capaz de inhibir la síntesis del aminoácido endógeno, siempre que sus niveles intracelulares estén por encima de lo que se requiere (Lidén, 1987). En el cerebro de ratones inyectados con fármacos que incrementan los niveles del GABA, como el AOAA o las hidrazinas (Sze y Lovell, 1970), se ha observado que el incremento en la concentración del GABA exógeno, produce una inhibición por producto de la enzima que lo sintetiza, la GAD, por un mecanismo de retroalimentación.

En el estudio sobre los efectos del SAG en los niveles de aminoácidos, el incremento observado en el GABA, hasta ocho veces sobre el control, se debe evidentemente al GABA que se administró exógenamente. Sin embargo, es importante hacer notar que una hora después de que el síndrome se ha hecho evidente en el EEG, la concentración del aminoácido regresa a sus niveles basales y así se mantiene hasta la extinción del SAG. Esto parece indicar que

existen mecanismos de transporte muy eficientes, que podrían regular el exceso en los niveles del aminoácido. En condiciones fisiológicas, el aminoácido se recaptura por las terminales nerviosas o por las células gliales, antes de ser metabolizado por la GABA-T. Otra forma de remoción podría ser a través de la difusión en el espacio extracelular. Es posible que todos estos eventos estén involucrados y expliquen conjuntamente la disminución en la concentración del GABA, posterior al exceso debido a la administración.

En estos experimentos el GABA infundido crónicamente podría entrar a la célula e inhibir la actividad de la GAD, como una forma de regulación por producto. Esta idea se apoya en los experimentos de *De Mello y col.* (1984, 1989), en los cuales los cultivos de neuronas de retina expuestas a GABA durante un tiempo prolongado, presentan un decremento en la síntesis del aminoácido. El efecto se previene al bloquear el canal de cloro acoplado al receptor GABA_A, mediante la adición de un antagonista GABAérgico, la picrotoxina. En estas células, utilizando técnicas de inmunocitoquímica se muestra un decremento en la cantidad de neuronas GAD-positivas (*De Mello 1984; De Mello y col. 1991; Hokoç y col., 1990*).

En el presente trabajo, durante el SAG la enzima continuó disminuída (artículo anexo), aún cuando los niveles de GABA tenían valores basales (Tabla 4). Esto descartaría la idea de que la actividad de la GAD se inhibe por producto, al menos en el transcurso del SAG. Es posible que el decremento enzimático se deba a la concentración del GABA intracelular, más que a una interacción

del aminoácido con la membrana neuronal postsináptica. Esta hipótesis se apoya en experimentos en cultivo de neuronas de corteza de rata (Rimvall y Martin, 1992) y en corteza cerebral in vivo (Rimvall y Martin, 1994, Martin y Rimvall., 1993), que muestran que la exposición por tiempos prolongados al GVG, inhibidor de la GABA-T, produce un incremento en el GABA intracelular y un decremento en la actividad de la GAD. Los efectos en las neuronas de corteza en cultivo no parecen involucrar receptores de GABA, ya que ni el muscimol ni el baclofén, ambos agonistas de los receptores GABA_A y GABA_B, respectivamente, afectan la actividad de la enzima (Rimvall y Martin, 1992).

Al término del SAG (POST-SAG), se observó que se requieren diez días después de la desaparición de las descargas en el EEG, para que la enzima se recupere totalmente. Las causas de que la actividad eléctrica se recupere antes que la actividad enzimática durante el período POST-SAG (artículo anexo), no fueron esclarecidas. Estos resultados sólo permiten sugerir que la actividad de la GAD está involucrada en alguno de los eventos que participan en el inicio y posiblemente en el mantenimiento del SAG. Es posible que la disminución en la actividad de la GAD se deba a un decremento en su síntesis.

Se sabe que la traducción del RNA mensajero para formar proteínas involucra varias etapas, en una de las cuales, el RNA mensajero se une a los ribosomas y forma un complejo de iniciación para la síntesis de proteínas. Este sitio podría estar involucrado en el desarrollo de las crisis convulsivas. Hay varios estudios que

sustentan esta idea (Dwyer y col., 1986). En conejos y ratones expuestos a choques eléctricos continuos para producir epilepsia, se ha mostrado una disminución en el RNA (MacInnes y col., 1970; Popoli y Giuditta, 1980) y este efecto continúa hasta un tiempo después de que el EEG regresó a su patrón de descargas normal. Además, en estos animales el número de polirribosomas cerebrales disminuye y se observa un desarreglo en la agregación. Por otro lado, la administración sistémica de aminoácidos marcados radioactivamente, muestra una inhibición en la incorporación de éstos a las proteínas cerebrales después del electrochoque (Dunn y col., 1974).

Las crisis convulsivas continuas también provocan un desarreglo polirribosomal, que no se debe a la activación de ribonucleasas, ya que la presencia de actinomicina D, la cual inhibe a la RNA polimerasa dependiente de DNA, no tiene ningún efecto (Wasterlain, 1977). Estos experimentos sugieren que la síntesis de proteínas se encuentra afectada durante las crisis epilépticas. Hasta ahora, en el modelo del SAG no se ha realizado la cuantificación de la proteína, pero el hecho de que el decremento en la actividad de la GAD, tenga una duración de varios días, aún cuando los niveles del GABA y la actividad eléctrica se han recuperado, sugiere una disminución en la tasa de síntesis de la proteína.

Existen varios trabajos en los que el tratamiento crónico con GABA o con drogas que mantienen incrementados los niveles de GABA, induce cambios en la expresión de la GAD. La expresión de las

proteínas puede regularse genéticamente, a nivel de la transcripción o traducción del RNAm, o a nivel de la estabilidad de la proteína (Feldblum, 1993; Rimvall y Martin, 1992). Estudios de inmunocitoquímica en neuronas de corteza cerebral de rata en cultivo (Rimvall y Martin, 1992), y en el animal completo (Rimvall y Martin, 1993; Rimvall y col., 1994), el tratamiento crónico con GVG incrementa los niveles de GABA y disminuye los niveles de la GAD₆₇.

En otros trabajos se ha observado que la expresión de la GAD también puede modificarse en diferentes neuropatologías. La lesión nigroestriatal por 6-OHDA o por ácido iboténico, produce un incremento en la expresión de la GAD en el globo pálido y en la sustancia nigra ipsilateral a la lesión, sin afectar el lado contralateral. Los principales cambios ocurren en la GAD₆₇ (Soghomonian y Chesselet, 1992; Segovia y col., 1990; Lindfors y col., 1989, 1990; Najlerahim y col., 1990). La lesión producida por la administración de 3-acetil piridina, en las fibras de la oliva bulbar inferior con proyección a las células de Purkinje en el cerebelo, incrementa la expresión del RNAm de la GAD, e induce descargas en estas células (Litwak y col., 1990). En un modelo de epilepsia inducida por la administración de ácido kaínico en el hipocampo de la rata (Feldblum y col., 1990), se observó que la expresión de la GAD se incrementa, probablemente como resultado de la hiperactividad cerebral inducida por las crisis que se presentan. Todos estos estudios indican que la expresión de la GAD₆₇, reflejada por el incremento en el RNAm observado, es un

proceso plástico, sensible a las condiciones imperantes en el medio ambiente, tanto circundante como intracelular, y cuya consecuencia es un aumento en la disponibilidad de la enzima, posiblemente como respuesta a una necesidad incrementada del neurotransmisor.

Por otro lado, los resultados del presente trabajo muestran que la actividad de las dos enzimas, determinada mediante la adición de PLP en concentraciones saturantes (artículo anexo) o en su ausencia (Tabla 1), se afectan de igual manera, por lo cual el decremento en la actividad de la GAD no se debe a la disponibilidad del cofactor.

En un trabajo previo (García-Ugalde y col., 1992), se logró reproducir el SAG *in vitro*. La incubación durante 2 horas en presencia de GABA 5 mM es una condición suficiente para inducir el SAG, determinado por registro intracelular de las células piramidales de la región CA₁ del hipocampo de la rata. Los resultados del presente trabajo en rebanadas de la corteza cerebral y del área CA₁ del hipocampo de la rata, incubadas durante 2 horas con GABA (Tabla 10), muestran que la actividad de la GAD, tanto en presencia como en ausencia del cofactor, no se alteró ni respecto al tejido recién extraído, ni comparando contra el tejido incubado en un medio fisiológico durante el mismo tiempo. Esto indica que la actividad de la enzima no se afecta de una manera semejante a como ocurre *in vivo*.

En el presente trabajo no se realizaron determinaciones a nivel de receptores. Sin embargo, con los datos aquí obtenidos, no es posible descartar una desensibilización del receptor, debido a

la infusión crónica del GABA, que explicara el desarrollo del SAG. Diferentes estudios han demostrado que la exposición durante un tiempo prolongado al GABA o al muscimol, desensibilizan a los receptores de GABA_A, lo cual se determina mediante la cuantificación de la conductancia del Cl⁻, o por cambios en la afinidad (Heninger y col., 1990; Maloteaux y col., 1987; Roca y col., 1989; Thalmann y Hershkowitz, 1985; Krnjevic, 1981; Schwartz y col., 1986), o en el número de receptores (Hablitz y col., 1989; Tehrani y col., 1988).

También se ha demostrado que el tratamiento crónico de GABA *in vitro*, induce alteraciones a nivel del RNAm de alguna de las subunidades que conforman el receptor GABA_A (Montpied y col., 1991). Estudios electrofisiológicos previos, en rebanadas de corteza de ratas tratadas crónicamente con GABA, muestran que en las curvas de dosis-respuesta en presencia de isoguvacina, que es un agonista del receptor GABA_A, se observa una inhibición en las descargas espontáneas de las neuronas con propiedades intrínsecas, lo cual es un índice de inhibición del receptor (Brailowsky y col., 1989). Este efecto podría deberse a desensibilización o tolerancia debida a un cambio en la afinidad o en el número de receptores. Sin embargo, es importante notar que el proceso de desensibilización de los receptores de GABA ocurre rápidamente, en el orden de 200 a 500 mseg en presencia del aminoácido utilizando concentraciones de 150 μ M (Cash y Subbarao, 1987a,b) mientras que la primera descarga que aparece como índice del SAG, de acuerdo con los datos de este trabajo, se presenta entre los 40 y los 80 minutos posteriores a la

interrupción de la infusión de GABA. Tales diferencias en los órdenes de magnitud temporal hacen poco probable a la desensibilización como proceso causal del SAG.

Existen trabajos que apoyan que el tratamiento crónico con GABA o muscimol, afecta la unión de ligandos al receptor de GABA. Maloteaux y col. en 1987 observaron que este tratamiento produce un decremento en la B_{max} , sin afectar la K_d .

Experimentos en los que se administra EOS, el cual es un inhibidor de la GABA-T, y por ello incrementa los niveles de GABA al impedir su degradación, muestran un aumento en el número de sitios del receptor de GABA, determinado por la unión del aminoácido marcado radioactivamente, sin modificar la afinidad de los receptores GABA_A y GABA_B (Sykes y col., 1984). Estos estudios evidencian la susceptibilidad de los receptores GABAérgicos a modificar su actividad en función de la presencia de distintos agentes que interaccionan con ellos, lo cual abre la posibilidad de que el SAG *in vitro* sea consecuencia únicamente de cambios a nivel postsináptico y explicara la ausencia de alteraciones en la actividad de la GAD. La valoración de tal posibilidad debe ser explorada.

Otro tipo de estudios que se utilizan para observar los cambios en el metabolismo del GABA durante la epilepsia, son a partir de la determinación de la salida del GABA marcado radioactivamente. Este aminoácido se libera de pozas intracelulares por estimulación con altas concentraciones de K^+ .

Las crisis epilépticas inducidas por electrochoque, en rebanadas de corteza cerebral y de hipocampo (Green y col., 1987), han mostrado que la liberación de GABA^H dependiente de Ca²⁺, estimulada por concentraciones elevadas de K⁺, se inhibe aproximadamente el 50%, sin afectar la liberación basal. Estos experimentos sugieren que durante las convulsiones hay una disminución en la salida de GABA.

Estudios *in vitro* de animales tratados crónicamente con benzodiazepinas, Hitchcott y col., (1990) han mostrado que la liberación de GABA^C, estimulada por altas concentraciones de K⁺ (20 mM), se incrementa el 100% sobre el valor basal. Este valor se mantiene hasta 1 día después del término del tratamiento, y posteriormente comienza a disminuir. Los autores sugieren que los receptores pudieran participar produciendo cambios a largo plazo en la transmisión inhibitoria.

En el presente trabajo utilizando rebanadas de la corteza frontal cerebral, se determinó el efecto crónico del GABA y del muscimol durante 4.5 h, sobre la liberación estimulada del GABA^H (Figura 8). Los resultados mostraron que el tejido incubado por tiempos prolongados sigue vivo, como lo demuestran los datos de la liberación en MK comparados con el tejido fresco. Esta liberación no es dependiente del calcio externo, ya que en su ausencia, durante la superfusión del tejido no se altera la salida del aminoácido.

En contraste con la hipótesis de que la entrada de calcio es un factor importante en la liberación de neurotransmisores, en

trabajos anteriores (Arias y Tapia, 1986) se ha demostrado que la liberación del GABA³H estimulada por K⁺ (48 mM), no depende de éste en preparaciones sinaptosomales, sino de la presencia de Na⁺. Esto podría explicar la falta de algún efecto al retirar el calcio en los resultados aquí presentados.

El tratamiento con GABA inhibe un 68% la liberación estimulada de GABA³H sobre el nivel basal en presencia de calcio, y aproximadamente el 88% en su ausencia. Sin embargo, ya que en estos experimentos se utilizó GABA³H exógeno los datos obtenidos en este trabajo solamente permiten sugerir que la disminución en la liberación del GABA³H, probablemente se debe a una dilución de la marca radioactiva en el tejido por la presencia prolongada con el aminoácido. El hecho de que el tratamiento con muscimol, el cual no entra a las terminales sinápticas sino que actúa a nivel postsináptico, no altera la liberación de GABA³H, argumenta en favor de que el tratamiento con el GABA podría estar diluyendo la marca radioactiva y por ello disminuyendo la liberación del GABA³H exógeno. Por otro lado, la carencia de efecto del tratamiento crónico con muscimol sobre la salida del GABA³H descarta una posible participación de los receptores postsinápticos.

VII CONCLUSIONES:

La exposición a GABA, durante un tiempo prolongado, en experimentos con rebanadas de corteza cerebral, induce una disminución en la liberación de GABA³H, estimulada por concentraciones elevadas de K⁺ (47 mM), probablemente debida a una dilución de la marca radioactiva. En estas condiciones, el tratamiento crónico con muscimol no tuvo ningún efecto sobre la liberación de GABA³H, lo cual puede deberse a que el agonista GABAérgico no entra a las terminales nerviosas. Estos resultados sugieren que la acción del GABA exógeno no es a nivel postsináptico.

En los experimentos *in vivo*, la interrupción del tratamiento crónico en animales tratados con GABA en la corteza motora, induce un decremento en la actividad de la GAD, y esto parece deberse a una disminución en la tasa de síntesis de la enzima. Lo anterior indica que la concentración de GABA puede ser un factor regulador de la síntesis de la GAD *in vivo*. La correlación temporal entre la recuperación de los niveles de GABA, la persistencia en la disminución de la actividad de la enzima, y la ocurrencia de descargas convulsivas en el EEG, sugiere que la disminución en la síntesis del GABA participa en el desarrollo del SAG *in vivo*.

VIII. REFERENCIAS

-Albers R.W. and Brady R.D. (1959). The distribution of glutamic acid decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* 234, 926-928.

-Arias C. and Tapia R. (1986). Differential calcium dependence of γ -aminobutyric acid and acetylcholine release in mouse brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 47 (2): 396-404.

-Arias C., Valero H. and Tapia R. (1992). Inhibition of brain glutamate decarboxylase is released to febrile seizures in rat pups. *J. Neurochem.* 58: 369-373.

-Bayón A., Possani L.D., Tapia M. and Tapia R. (1977a). Kinetics of brain glutamate decarboxylase. Interactions with glutamate, pyridoxal 5'-phosphate and glutamate-pyridoxal 5'-phosphate Schiff base. *J. Neurochem.* 29: 519-525.

-Bayón A., Possani L.D. and Tapia R. (1977b). Kinetics of brain glutamate decarboxylase. Inhibition studies with N-(5'-phosphopyridoxyl) amino acids. *J. Neurochem.* 29: 513-517.

-Bayón A., Possani L.D., Rode G. and Tapia R. (1978). Kinetics of brain glutamate decarboxylase. Dead-end and product inhibition studies. *J. Neurochem.* 30: 1629-1631.

-Benson D.L., Isackson P.J., Hendry S.H.C. and Jones E.G. (1991). Differential gene expression for glutamic acid decarboxylase and type II calcium-calmodulin-dependent protein kinase in basal ganglia, thalamus, and hypothalamus of the monkey. *J. Neurosci.* 11 (6): 1540-1564.

-Bormann J. (1988). Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *TINS* 11(3): 112-116.

-Brailowsky S., Menini C., Silva-Barrat C. and Naquet R. (1987). Epileptogenic γ -aminobutyric acid-withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons. *Neurosci. Lett.* 74, 75-80.

-Brailowsky S., Kunimoto M., Menini Ch., Silva-Barrat C., Riche D. and Naquet R. (1988). The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain Res.* 442, 175-179.

-Brailowsky S., Kunimoto M., Silva-Barrat C., Menini, C. and Naquet, R. (1990). An electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in the rat. *Epilepsia* 31: 369-377.

-Brailowsky S., Montiel T., Hernández E., Marescaux C. and Vergnes M. (1992). Effects of 3-hydroxy-3-ethyl-3-phenylpropionamide (HEPP) on rat models of generalized and focal epilepsy. *Epilepsy Res.* 11: 167-172.

-Bu D.F., Erlander, M.G., Hitz, B.C., Tillakaratne, N.J.K., Kaufman, D.L., Wagner-Mc Pherson, C.B., Evans, G.A. y Tobin, A.J. (1992). Two human glutamate decarboxylases, 65-KDa GAD and 67-KDa GAD are each encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 2115-2119.

-Carvajal G., Russek M., Tapia R. and Massieu G. (1964). Anticonvulsive action of substances designed as inhibitors of γ -aminobutyric- α -ketoglutaric transaminase. *Biochem Pharmacol*. 13: 1059-1069.

-Cash D.J. and Subbarao K. (1987). Desensitization of the γ -aminobutyric acid receptor from rat brain: two distinguishable receptors on the same membrane. *Biochem*. 26: 7556-7562.

-Cash D.J. and Subbarao K. (1987). Two desensitization processes of GABA receptor from rat brain. Rapid measurements of chloride ion flux using quench-flow techniques. *FEBS lett*. 217 (1): 129-133.

-Chang Y. and Gottlieb D.I. (1988) Characterization of protein purified with monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase. *J. Neurosci*. 8: 2123-2130.

-Chapman A.G. (1991) Excitatory amino acid antagonists and therapy of epilepsy. In: Excitatory amino acid antagonists.

Frontiers in pharmacology and therapeutics (Meldrum B.S., ed). pp. 265-286.

-Collins R.C. and Olney J.W. (1982). Focal cortical seizures cause distant thalamic lesions. *Science* 218: 177-179.

-Coursin D.B. (1960). Seizures in vitamin B₆ deficiency. In: Inhibition in nervous system and Gamma-aminobutyric acid (E. Roberts., C.F. Baxter, A. Van Harreveld, C.A.G. Wiersma, W.R. Adey and K.F. Killam, eds). Pergamon Press, Oxford. pp. 294-301.

-Covarrubias M. and Tapia R. (1978) Calcium-dependent binding of brain glutamate decarboxylase to phospholipid vesicles. *J. Neurochem.* 31: 1209-1214.

-Covarrubias M. and 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.

-Dakshinamurti K. and Stephens M.C. (1969). Pyridoxine deficiency in the neonatal rat. *J. Neurochem.* 16: 1515-1522.

-De Lorey T.M. and Olsen R.W. (1992). γ -aminobutyric acid_A receptor structure and function. *J. Biol. Chem.* 267 (24): 16747-16750.

-De Lorey T.M. and Olsen R.W. (1994) GABA and glycine. In: Basic Neurochemistry (Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W. and Molinoff P.B., eds). 5 ed, Raven Press, N.Y. pp.389-399.

-De Mello F.G. (1984) GABA-mediated control of glutamate decarboxylase (GAD) in cell aggregate culture of chick embryo retina. *Dev. Brain Res.* 14: 7-13.

-De Mello F.G., Hocoç J.N., Ventura A.L.M. and Gardino P.F. (1991). Glutamic acid decarboxylase of embrionic avian retina cells in culture: regulation by γ -aminobutyric acid (GABA). *Cell Mol. Neurobiol.* 11: 485-496.

-Denner L.A. and Wu J.Y. (1985) Two forms of brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate. *J. Neurochem.* 44 (3): 957-965.

-Dunn A., Giuditta A., Wilson J.E. and Glassman E. (1971) The effect of electroconvulsive shock on protein synthesis in mouse brain. *J. Neurochem.* 18: 2093-2099.

-Dwyer B.E., Wasterlain C.G., Fujikawa D.G. and Yamada L. (1986). Brain protein metabolism in epilepsy. In: Advances in Neurology. vol 44. Delgado-Escueta A.V., Ward Jr. A.A., Woodbury D.M. and Porter R.J. eds. Raven Press, New York. 903-918.

-Erlander M.G., Tillakaratne N.J.K., Feldblum S., Patel N. and Tobin A.J. (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7: 91-100.

-Erlander M.G. and Tobin A.J. (1991). The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res.* 16: 215-226.

-Esclapez M., Tillakaratne N.J.K., Kaufman D.L., Tobin A.J. and 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.

-Fagg G.E. and Massieu L. (1991) Excitatory amino acid receptor subtypes. In: Excitatory amino acid antagonists. *Frontiers in pharmacology and therapeutics* (Meldrum B.S., ed). pp. 39-63.

--Feldblum S., Ackerman R.F. and Tobin A.J. (1990) Long-Term increase of glutamate decarboxylase mRNA in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuron* 5: 361-371.

-Feldblum S., Erlander MG and Tobin AJ. (1993). Rapid Communication. Different distributions of GAD-65 and GAD-67 mRNA suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J. Neurosci. Res.* 34: 689-706.

-File SE (1990). The history of benzodiazepine dependence: a review of animal studies. *Neurosci. Behav. Rev.* 14: 135-146.

-Fricke U. (1975). Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton-X-100. *Anal. Biochem.* 63: 555-558.

-Fukuda H., Brailowsky S., Menini C., Silva-Barrat C., Riche D. and Naquet R. (1987) Anticonvulsant effect of intracortical, chronic infusion of GABA in kindled rats: focal seizures upon withdrawal. *Exp. Neurol.* 98: 120-129.

-García-Ugalde, G. Galarraga E, Bargas J. and Brailowsky S. (1992). Hyperexcitability of hippocampal CA₁ region in brain slices after GABA withdrawal. *Neurosci. Lett* 147: 229-232.

-Geddes J.W. and Wood J.D. (1984) Changes in the amino acid content of nerve endings (synaptosomes) induced by drugs that alter the metabolism of glutamate and γ -aminobutyric acid. *J. Neurochem.* 42: 16-24.

-Greif K.F., Erlander M.G., Tillakaratne N.J.K. and Tobin A.J. (1991). Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum. *Neurochem. Res.* 16: 235-242.

-Greif K.F., Tillakaratne N.J.K., Erlander M.G., Feldblum, S. and Tobin A.J. (1992). Transient increase in expression of a

glutamate decarboxylase (GAD) mRNA during postnatal development of the rat striatum. *Dev. Biol.* 152: 1-7.

-Green A.R., Minchin M.C.W. and Vincent N.D. (1987). Inhibition of GABA release from slices prepared from several brain regions of rats at various times following a convulsion. *Br. J. Pharmacol.* 92: 13-18.

-Grossfeld R.M., Yancey S.W. and Baxter C.F. (1984). Inhibitors of crayfish glutamic acid decarboxylase. *Neurochem. Res.* 9 (7): 947-963.

-Hablitz J.J., Tehrani M.H. and Barnes Jr. E.M. (1989). Chronic exposure of developing cortical neurons to GABA downregulates GABA/Benzodiazepine receptors and GABA-gated chloride currents. *Brain Res.* 501: 332-338.

-Halonen T., Pitkanen A., Saano V. and Riekkinen P.J. (1991). Effects of vigabatrin (γ -vinyl GABA) on neurotransmission-related amino acids and on GABA and benzodiazepine receptor binding in rats. *Epilepsia* 32(2): 242-249.

-Heninger C., Saito N., Tallman J.F., Garret K.M., Vitek M.P., Duman R.S. and Gallager G.W. (1990). Effects of continuous diazepam administration on GABA A subunit mRNA in rat brain. *J. Mol. Neurosci.* 2: 101-107.

-Hill J.M. and Switzer R.C. (1984) the regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neurosci.* 11: 595-603.

-Hitchcott P.K., File S.E., Ekwuru M. and Neal M.J. (1990). Chronic diazepam treatment in rats causes long-lasting changes in central [³H]-5-hydroxytryptamine and [¹⁴C]- γ -aminobutyric acid release. *Br. J. Pharmacol.* 99: 11-12.

-Hokoç J.N., Ventura L.M., Gardino P.F. and De Mello F.G. (1990). developmental immunoreactivity for GABA and GAD in the avian retina: possible alternative pathway for GABA synthesis. *Brain Res.* 532: 197-202.

-Huang W.M., Reed-Fourquet L., Wu E. and Wu J.Y. (1990). Molecular cloning and amino acid sequence of brain L-glutamate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 8491-8495.

-Jackson M.C., Scollard D.M., Mack R.J. and Lenney J.F. (1994) Localization of a novel pathway for the liberation of GABA in the human CNS. *Brain Res. Bull.* 33: 379-385.

-Julien J.F., Samama P. and Mallet J. (1990). Rat brain glutamic acid decarboxylase sequence deduced from a cloned cDNA. *J. Neurochem.* 54(2): 703-705.

-Karlson A.E., Hagopian W.A., Grubin C.E., Dube S., Disteché C.M., Adler D.A., Barmeier H., Mathewes S., Grant F.J., Foster D. and 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.

-Kaufman D.L., Houser C. R. and Tobin A.J. (1991) Two forms of the GABA synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J. Neurochem.* 56 (2): 720-723.

-Kendall D.A., Fox D.A. and Enna S.J. (1981). Effect of vinyl GABA on bicuculline-induced seizures. *Neuropharmacol.* 20:351-355.

-Killam K.F., Dasgupta S.R. y Killam E.K. (1960). Studies of the action of convulsant hydrazides as vitamin B₆ antagonists in the central nervous system. In: *Inhibition in the Nervous System and Gamma-aminobutyric acid*, edited by E. Roberts. Pergamon Press, Oxford. pp 302-316

-Kobayashi Y., Kaufman D. and Tobin A.J. (1987). Glutamic acid decarboxylase cDNA: nucleotide sequence encoding an enzymatically active fusion protein. *J. Neurosci.* 7 (9): 2768-2772.

-Krnjevic K. (1981) Desensitization of GABA receptors. In: GABA and Benzodiazepine receptors (E. Costa et al. eds.), Raven Press, New York, pp. 111-120.

-Legay F., Henry S. and Tappaz M. (1987) Evidence for two distinct forms of native glutamic acid decarboxylase in rat brain soluble extract: An immunoblotting study. *J. Neurochem.* 48 (4): 1022-1026.

-Lidén E., Karlsson L. and Sellstrom A. (1987). Is the concentration of γ -aminobutyric acid in the nerve terminal regulated via product inhibition of glutamic acid decarboxylase? *Neurochem. Res.* 12(5): 489-493.

-Lindfors N., Brené S. and Persson H. (1990). Increased expression of glutamic acid decarboxylase mRNA in rat substantia nigra after an ibotenic acid lesion in the caudate-putamen. *Mol. Brain Res.* 7: 207-212.

-Lindfors N., Brene S., Herrera-Marschitz M. and Persson H. (1989). Region specific regulation of glutamic acid decarboxylase mRNA expression by dopamine neurons in rat brain. *Exp. Brain Res.* 77: 611-620.

-Litwak J., Mercugliano M., Chesselet M.F. and Oltmans G.A. (1990). Increased glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and GAD

activity in cerebellar Purkinje cells following lesion-induced increases in cell firing. *Neurosci. Lett.* 116: 179-183.

-Liu Z., Seiler N., Marescaux C., Depaulis A. and Vergnes M. (1990). Potentiation of γ -vinyl GABA (vigabatrin) effects by glycine. *Eur. J. Pharmacol.* 182: 109-115.

-Lloyd K.G., Bossi L., Morselli P.L., Munari C., Rougier M. and Loiseau H. (1986) Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy. In: *Advances in neurology*. (Delgado-escueta A.V., Ward Jr. A.A., Woodbury D.M. and Porter R.J., eds). Raven Press. pp. 1033-1044.

-López-Colomé A.M. (1983). Ácidos glutámico y aspártico. En: *Aminoácidos y péptidos en la integración de las funciones nerviosas*. Compiladores: Pasantes-Morales H. y Aréchiga H. UNAM, México. pp. 93-105.

-Löscher W., Honack D. and Gramer M. (1989) Use of inhibitors of γ -aminobutyric acid (GABA) turnover in various brain regions of rats: a reevaluation of aminooxyacetic acid. *J. Neurochem.* 53 (6):1737-1750.

-Lówy O., Rosebrough N., Farr A. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

-MacInnes J.W., McConkey E.H. and Schlesinger K. (1970) Changes in brain polyribosomes following an electro-convulsive seizure. *J. Neurochem.* 17: 457-460.

-Maloteaux J.M., Octave J.N., Gossuin A., Laterre C. and Trouet A. (1987). GABA induces down-regulation of the benzodiazepine-GABA receptor complex in the rat cultured neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 144: 173-183.

-Manyam N.V.B., Katz L., Hare T.A., Gerber J.C. and Grossman M.H. (1980). Levels of gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid in various neurologic disorders. *Arch. Neurol.* 37: 352-355.

-Martin D.L., Martin S.B., Wu S.J. and Espina N. (1991,a) Regulatory properties of brain glutamate decarboxylase (GAD): The apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. *J. Neurosci.* 11 (9): 2725-2731.

-Martin D.L., Martin S.B., Wu S.J. and Espina N. (1991,b) Cofactor interactions and the regulation of glutamate decarboxylase activity. *Neurochem. Res.* 16: 243-249.

-Martin D.L. and Rimvall K. (1993) Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.* 60 (2): 395-407.

-Massieu L., Rivera A. and Tapia R. (1994). Convulsions and inhibition of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate- γ -glutamyl hydrazone in the developing rat. *Neurochem. Res.* 19(2): 183-187.

-Matsui Y. and Kamioka T. (1978). The effects of elevating γ -amino butyrate content in the substantia nigra on the behaviour of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 50: 243-251.

-Matsumoto R.R. (1989). GABA receptors: are cellular differences reflected in function? *Brain Res. Rev.* 14: 203-225.

-Meldrum B.S. (1975) Epilepsy and γ -aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int. Rev Neurobiol.* 17: 1-36.

-Menini C., Mraovitch S., Calando Y., De la Sayette V., Silva-Barrat C., Brailowsky S. and Seylaz J. (1991). Metabolic anatomy of the focal epilepsy produced by cessation of chronic intracortical GABA infusion in the rat. *Neurosci.* 41(2): 607-615.

-Montpied, P., Ginns E.I., Martin B.M., Roca D., Farb D.H. and Paul S.M. (1991). γ -aminobutyric acid (GABA) induces a receptor-mediated reduction in GABA_A receptor α -subunit messenger RNAs in embryonic chick neurons in culture. *J. Biol. Chem.* 266(10): 6011-6014.

-Najlerahim A., Showell D.G.L. and Pearson R.C.A. (1991). Transient increase in glutamic acid decarboxylase mRNA in the cerebral cortex following focal cortical lesion in the rat. *Exp. Brain Res.* 87: 113-118.

-Neal M.J. and Shah M.A. (1990) Development of tolerance to the effects of vigabatrin (γ -vinyl-GABA) on GABA release from rat cerebral cortex, spinal cord and retina. *Br. J. Pharmacol.* 100: 324-328.

-Olsen R.W. and Tobin A.J. (1990). Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB J.* 4:1469-1480.

-Paxinos G. and Watson C. (1986) The rat in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sidney.

-Pérez de la Mora M. and Tapia R. (1973). Anticonvulsant effect of 5-ethyl, 5-phenyl, 2-pyrrolidinone and its possible relationship to γ -aminobutyric acid-dependent inhibitory mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 22: 2635-2639.

-Perry T.L., Kish S.J. and Hansen S. (1979) γ -vinyl GABA: Effects of chronic administration on the metabolism of GABA and other amino compounds in rat brain. *J. Neurochem* 32: 1641-1645.

-Popoli M. and Giuditta A. (1980) Effect of electroconvulsive shock on polysomes of rabbit brain, liver and kidney. *J. Neurochem.* 35: 1319-1322.

-Porter T.G. and Martin D.L. (1984) Evidence for feedback regulation of glutamate decarboxylase by γ -aminobutyric acid. *J. Neurochem.* 43: 1464-1467.

-Ribak C.E., Hunt C., Bakay R.A.E. and Oertel W.H. (1986). A decrease in the number of GABAergic somata is associated with the preferential loss of GABAergic terminals at epileptic foci. *Brain Res.* 363: 78-90.

-Rimvall K. and Martin D.L. (1992) Increased intracellular γ -aminobutyric acid selectively lowers the level of the larger of two glutamate decarboxylase proteins in cultured GABAergic neurons from rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 58: 158-166.

-Rimvall K., Sheikh S.N. and Martin D.L. (1993) Effects of increased γ -aminobutyric acid levels on GAD67 protein and mRNA levels in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 60 (2): 714-720.

-Rimvall K. and Martin D.L. (1994). The level of GAD67 protein is highly sensitive to small increases in intraneuronal γ -aminobutyric acid levels. *J. Neurochem.* 62 (4): 1375-1381.

-Roberts E., Wein J. and Simonsen D.G. (1964). γ -aminobutyric acid (γ -GABA), vitamin B₆, and neuronal function.- A speculative synthesis. In: Vitamins and hormones. vol 22 (R.S. Harris, I.G. Wool and J.A. Loraine, eds). Academic Press, New York. pp. 503-559.

-Roca D.J. Rosenberg I., Farrant M. and Farb D.H. (1989). Chronic agonist exposure induces down-regulation and allosteric uncoupling of the γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex. *Mol. pharmacol.* 37: 37-43.

-Rubio-Donnadieu F. (1989) Generalidades y clasificacion de la epilepsia. En: Epilepsia: un enfoque multidisciplinario. (Eds. Feria A., Martínez D. y Rubio-Donnadieu F.). México. pp. 19-27.

-Rubio-Donnadieu F. (1991) Aplicabilidad de los modelos experimentales de la epilepsia a la clinica. En: Epilepsia experimental. Series en Neurología, No. 2 (Ed. Otero-Silíceo E.). pp. 17-26.

-Saunders P.A., Ito Y., Baker M.L., Hume A.S. and Ho I.K. (1990). Pentobarbital tolerance and withdrawal: correlation with effects on the GABA receptor. *Pharmacol. biochem. behav.* 37: 343-348.

-Schwartz R.D., Suzdak P.D. and Paul S.M. (1986) γ -aminobutyric acid (GABA) and barbiturate mediated ³⁶Cl-uptake in rat

brain synaptoneuroosomes: evidence for rapid desensitization of the GABA receptor-coupled chloride ion channel. *Mol. Pharmacol.* 30, 419-426.

-Segovia J., Tillakaratne, N.J.K., Whelan K., Tobin A.J., and Gale K. (1990). Parallel increases in striatal glutamic acid decarboxylase activity and mRNA levels in rats with lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res.* 529: 345-348.

-Seiler N. and Al-Therib M.J. (1974). Putrescine catabolism in mammalian brain. *Biochem. J.* 144: 29-35.

-Sharma J.K. and Dakshinamurti K. (1992). Seizure activity in pyridoxine-deficient adult rats. *Epilepsia* 33 (2): 235-247.

-Silva-Barrat C., Champagnat J., Brailowsky S., Menini C. and Naquet R. (1989) Relationship between tolerance to GABA_A agonist and bursting properties in neocortical neurons during GABA-withdrawal syndrome. *Brain Res.* 498: 289-298.

-Silva-Barrat C., Araneda S., Menini C., Champagnat J., and Naquet R. (1992) Burst generation in neocortical neurons after GABA withdrawal in the rat. *J. Neurophysiol.* 67 (3): 715-727.

-Soghomonian J.J., Gonzales C., Chesselet M.F. (1992). Messenger RNAs encoding glutamate decarboxylases are

differentially affected by nigrostriatal lesions in subpopulations of striatal neurons. *Brain Res.* 576: 68-79.

-Solís H. y Arauz J. (1989) Modelos experimentales en epilepsia. En: *Epilepsia: Un enfoque multidisciplinario*. Eds. Feria A, Martínez D. y Rubio F. 2a ed., Trillas SA de CV. pp. 74-97.

-Stephenson F.A. (1988) Understanding the GABA_A receptor: a chemically gated ion channel. *Biochem. J.* 249: 21-32.

-Sykes C., Prestwich S. y Horton R. (1984) Chronic administration of the GABA-transaminase inhibitor ethanolamine-O-Sulphate leads to up-regulation of GABA binding sites. *Biochem. Pharmacol.* 33(3): 387-393.

-Sze P.Y. and Lovell R.A. (1970). Reduction of level of L-glutamic acid decarboxylase by γ -aminobutyric acid in mouse brain. *J. Neurochem.* 17: 1657-1664.

-Tapia R. and Awapara J. (1967). Formation of γ -aminobutyric acid (GABA) in brain of mice treated with L-glutamic acid- γ -hydrazide and pyridoxal phosphate- γ -glutamyl hydrazone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126: 218-221.

-Tapia R. and Awapara J. (1969). Effect of various substituted hydrazones and hidrazines of pyridoxal-5'-phosphate on brain glutamate decarboxylase. *Biochem. Pharmacol.* 18: 145-152.

-Tapia R. and Sandoval M.E. (1971) Study on the inhibition of brain glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate-oxime-O-acetic acid. *J. Neurochem.* 18: 2051-2059.

-Tapia R. (1975) Biochemical pharmacology of GABA in CNS. In: *Handbook of Psychopharmacology*, vol. 4. Iversen L.L., Iversen S.D. and Snyder S.H. eds. pp 1-58. Plenum Press, New York.

-Tapia R., Sandoval M.E. and Contreras P. (1975) Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. *J. Neurochem* 24: 1283-1285.

-Tapia R. Aspectos bioquímicos de la epilepsia. (1976) *Gaceta Médica de México* 112 (1): 6-13.

-Tapia R. (1980) Convulsions and the function of GABAergic synapses. In: *Neurochemistry and clinical neurology*. (Battistin L.G., Hashim G. and Lajtha A., eds.). Alan R. Liss, N.Y. pp. 123-131.

-Tapia R. (1983). Regulation of glutamate decarboxylase activity. En: Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous System, Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 113-128.

-Tapia R. (1983) γ -Aminobutyric acid. Metabolism and biochemistry of synaptic transmission. In: Handbook of neurochemistry, 2nd ed., vol 3 (Lajtha A., ed) Plenum Press, N.Y. pp. 423-466.

-Tapia R. and Salazar P. (1991). Glutamate decarboxylase activity in the substantia nigra and the hippocampus of rats microinjected with inhibitors of the enzyme. *Neurochem. Res.* 16 (3): 263-267.

--Tapia R. (1991) Alteraciones neuroquímicas asociadas a las epilepsias. En: *Epilepsia experimental. Series en Neurología*, No. 2 (Ed. Otero-Silíceo E.) pp. 37-45.

-Tehrani M.H.J. and Barnes Jr. E.M. (1988). GABA down-regulates the GABA/Benzodiazepine receptor complex in developing cerebral neurons. *Neurosci. Lett.* 87: 288-292.

-Tillakaratne N.J.K., Erländer M.G., Collard M.W., Greif K.F. and Tobin A.J. (1992). Glutamate decarboxylases in nonneural cells of rat testis and oviduct: Differential expression of GAD65 and GAD67. *J. Neurochem.* 58 (2): 618-627.

-Thalmann R. and Hershkowitz N. (1985) Some factors that influence the decrement in the response to GABA during its continuous iontophoretic application to hippocampal neurons. *Brain Res.* 342: 219-233.

-Van der Heyden J.A.M., Venema K. and Korf J. (1979) In vivo release of endogenous GABA from rat substantia nigra measured by a novel method. *J. Neurochem.* 32: 469-476.

-Wasterlain C.G. (1977) Effects of epileptic seizures on brain ribosomes: Mechanism and relationships to cerebral energy metabolism. *J. Neurochem.* 29: 707-716.

-Wood J.D., Russell M.P. and Kurylo E. (1980) The aminobutyrate content of nerve endings (synaptosomes) in mice after the intramuscular injection of aminobutyrate-elevating agents: a possible role in anticonvulsant activity. *J. Neurochem.* 35: 125-130.

-Wu J.Y. and Roberts E. (1974). Properties of brain L-glutamate decarboxylase: inhibition study. *J. Neurochem.* 23: 759-767.

-Wyborski R.J., Bond R.W. and Gottlieb D.I. (1990). Characterization of a cDNA coding for rat glutamic acid decarboxylase. *Mol. Brain Res.* 8: 193-198.