

00377



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO GABAÉRGICO  
DE LAS CÉLULAS GRANULARES DEL GIRO  
DENTADO DEL HIPOCAMPO DE LA RATA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**P R E S E N T A :**  
**MÓNICA RAMÍREZ RUANO**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**Dr. RAFAEL GUTIÉRREZ AGUILAR**

México, D.F.

Agosto 2004



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 esta 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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO GABAÉRGICO  
DE LAS CELULAS GRANULARES DEL GIRO  
DENTADO DEL HIPOCAMPO  
DE LA RATA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T A  
MÓNICA RAMÍREZ RUANO**

**DIRECTOR DE TESIS  
Dr. RAFAEL GUITIERREZ AGUILAR**

**México, D.F.**



**Agosto 2004**

**COORDINACIÓN**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de la Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 03 de noviembre del 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Ramírez Ruano Mónica**, con número de cuenta 95542346, y número de expediente 3991081 con la tesis titulada: "**Caracterización del fenotipo GABAérgico de la células granulares del giro dentado del hipocampo de la rata**", bajo la dirección del(a) **Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar**.

Presidente:	Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoitia
Vocal:	Dra. Ana Brigida Clorinda Arias Alvarez
Secretario:	Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar
Suplente:	Dra. Gloria Acacia Benitez King
Suplente:	Dra. Graciela Meza Ruiz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de abril de 2004.

Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

Los experimentos de este trabajo se realizaron en el centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN-CINVESTAV y se contó con el apoyo de una beca para la elaboración de tesis de Maestría financiada por el donativo de CONACYT 36178-N otorgado al Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar.

Miembros del Comité Tutorial:

Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar CINVESTAV.  
Dra. Graciela Meza Ruiz IFC- UNAM.  
Dr. Ricardo Tapia Ibarguengoitia IFC- UNAM

### **Agradecimientos:**

A mi familia, a mi Madre y sobre todo a Verónica por su apoyo incondicional.

A mis Amigos de siempre Ruth, Yimeh, a mis amigos de la Facultad de Ciencias a Antonio, Aurea, Angel, Blas, Osvaldo, Virginia, Esmeralda, Mauricio, a David García, David Barrera y por supuesto una mención especial merece Edith por alentarme para iniciar y terminar una maestría.

Al Dr. Rafael Gutiérrez mi gratitud por darme la oportunidad de colaborar en su grupo de investigación y mostrarme con su ejemplo lo apasionante que puede ser la investigación científica.

A mis compañeros de laboratorio Adrián, Carmen, Héctor, especialmente a Gisela por sus acertadas sugerencias.

### **Agradecimientos Técnicos:**

A la Dra. Mónica Lamas Gregori por su colaboración y asesoría para la optimización de las técnicas de biología molecular.

Al Ricardo Tapia Ibarguengoitia por aceptar ser miembro de mi comité tutorial y su asesoría durante el desarrollo del proyecto.

A las Dras. Clorinda Arias y Gloria A. Benítez King por sus comentarios para la corrección del texto final.

A la QFB Jasmín Maqueda Mendoza por compartir conmigo su experiencia en el manejo del microscopio confocal.

Al Sr. Benjamín Muñoz Ramírez por su asistencia técnica.

# INDICE

Página

**Resumen**..... 1

**Capítulo I Anatomía del Hipocampo**..... 4

1.1. Introducción

1.2. Tipos celulares principales

1.3. Células granulares

1.4. Células piramidales

1.5. Interneuronas

1.6. Circuito trisináptico

**Capítulo II Ácido  $\gamma$ -Aminobutírico GABA**..... 13

2.1 Generalidades

2.2. Isoformas de la GAD

2.3. Regulación de la síntesis de GABA

2.4. GABA y epilepsia

2.5 Papel del GABA durante el desarrollo

**Capítulo III** ..... 20

2.6 Transmisión Glutamatérgica y GABAérgica simultánea en la sinapsis formada por las células granulares y neuronas en CA3.

**Capítulo IV**..... 25

4.1. Justificación..... 25

4.2. Hipótesis..... 26

4.3. Objetivos ..... 26

**Capítulo V**

**Material y Método** ..... 27

5.1 Procedimiento para el método de epileptización, kindling

5.2. Preparación quirúrgica

5.3. Protocolo de estimulación eléctrica	
5.4. Grupos experimentales	
5.5. Diseño de oligonucleótidos	
5.6. Preparación del tejido para la determinación de ARNm	
5.7. RT-PCR <i>in situ</i>	
5.8. Uso combinado de RT-PCR e hibridación <i>in situ</i>	
5.9. Preparación y síntesis de las sondas VGAT	
5.10. Síntesis y marcaje de la sonda	
5.11. Hibridación <i>in situ</i>	
5.12. Análisis histológico	
5.13. Inmunofluorescencia para GAD 67	
5.14. Inmunohistoquímica para GAD 65	
<b>Capítulo VI Resultados</b>	<b>38</b>
6.1 RT-PCR <i>in situ</i>	
6.1.2 Experimentos control	
6.1.3 Controles negativos	
6.1.4 Controles positivos	
6.2. Grupos experimentales	
6.2.1 Grupo control	
6.2.2. Grupo experimental ratas con crisis convulsivas (kindling)	
6.3 Hibridación <i>in situ</i>	
6.4 Técnica combinada de RT-PCR e hibridación <i>in situ</i>	
6.5 Caracterización del fenotipo GABAérgico de las células granulares del giro dentado en diferentes etapas del desarrollo.	
6.5.1. Inmunofluorescencia para GAD 67	
6.5.2. Inmunohistoquímica para GAD 65	
<b>Capítulo VII Discusión</b>	<b>53</b>
<b>Referencias</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO Artículos Publicados</b>	



## Abreviaturas

ABC	Complejo avidina-biotina
ApoGAD	Forma inactiva de la GAD
ATP	Trifosfato de adenosina
BNDF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CCG	Crisis convulsivas generalizadas
cDNA	DNA complementario
DAB	Diaminobenzidina
FM	Fibras musgosas
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GABA-T	GABA aminotransferasa
GAD65	Glutamato descarboxilasa 65 isoforma de menor peso molecular
GAD67	Glutamato descarboxilasa 67
GD	Giro dentado
H	Hilus
HoloGAD	Forma activa de la GAD
i.p.	intraperitoneal
PBS	Buffer salino de fosfatos
PLP	Fosfato de Piridoxal
PTZ	Pentilenetetrazol
VGAT	Transportador vesicular de GABA
v.o.	vía oral
U.I.	Unidades Internacionales

## Resumen

A pesar de que se ha considerado que las células granulares del hipocampo son glutamatérgicas, se han acumulado evidencias que sugieren que estas células también son capaces de liberar Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) sobre sus células blanco de la región CA3. Las células granulares contienen normalmente cantidades mínimas de GAD (descarboxilasa del ácido glutámico) y GABA. Además los niveles de GAD67 y de su ARNm se incrementan después de diversas manipulaciones que producen hiperexcitación. Estos aumentos coinciden con la presencia de respuestas monosinápticas inhibitoras en células piramidales e interneuronas de CA3 ante la estimulación de las células granulares. Esto apoya la hipótesis de que las células granulares sintetizan y liberan GABA y glutamato simultáneamente. Sin embargo, en animales jóvenes estas respuestas inhibitoras provenientes del giro dentado se presentan en condiciones normales.

En ambas condiciones en las que se presenta la liberación de GABA de las fibras musgosas (durante el desarrollo y después de la inducción de hiperexcitabilidad en el adulto), se ha detectado por medio de la técnica de RT-PCR, la presencia de ARNm que codifica para el transportador vesicular de GABA (VGAT) en sinaptosomas de fibras musgosas, y del giro dentado. Si bien estos hallazgos han sugerido la existencia y regulación del ARNm del VGAT en las células granulares, hasta ahora no ha detectado el ARNm de VGAT en los somas de las células granulares usando la técnica de hibridación *in situ*.

Otro marcador del fenotipo GABAérgico neuronal, la GAD65 se ha relacionado con la síntesis del GABA liberable, sin embargo existe la duda sobre cómo se modula la expresión de esta isoforma de la GAD después de generar crisis convulsivas. Por lo tanto en este

trabajo nos propusimos confirmar la existencia del ARNm de VGAT en los somas de las células granulares y determinar la presencia del ARNm de GAD65 en animales epilépticos, y la expresión de las proteínas GAD67 y 65 en ratas jóvenes.

Se utilizó la técnica de RT-PCR *in situ* para detectar GAD65 en animales control y epilépticos, y los resultados muestran que, al contrario de lo que sucede con la GAD67, las crisis convulsivas no producen modificaciones en la expresión del ARNm de GAD65. Por otro lado, desarrollamos la técnica que combina la RT-PCR y la hibridación *in situ* para detectar el ARNm de VGAT. Con esta técnica, en rebanadas de hipocampo inicialmente se amplifica el mensajero que, posteriormente, puede ser hibridado a una sonda específica. Además del incremento en la sensibilidad de la detección del RNA, esta técnica permite la localización anatómica precisa de los productos amplificados. Así, confirmamos la presencia del ARNm que codifica para VGAT en las células granulares. Concluimos que las células granulares expresan todos los marcadores GABAérgicos por lo que proponemos que, efectivamente, son capaces de sintetizar, vesicular y liberar GABA como respuesta a periodos de hiperexcitación.

Por otro lado, con los experimentos de inmunohistoquímica para las dos isoformas de la GAD en animales jóvenes, encontramos que en las terminales de las fibras musgosas se expresa la GAD67 y desaparece en los animales adultos. La expresión y desaparición de la GAD67 coincide con la transmisión GABAérgica del giro dentado a CA3, (confirmada con registros electrofisiológicos en células piramidales realizados en nuestro grupo de investigación). Sin embargo, la inmunorreactividad de la otra isoforma, la GAD65, no presenta el mismo patrón anatómico de expresión, ya que no se detecta en fibras musgosas

a ninguna edad. Estos resultados sugieren que la expresión del fenotipo GABAérgico en las células granulares durante el desarrollo puede tener una acción neurotrófica sobre CA3, y la liberación de GABA en el adulto, que solo se detecta tras periodos de hiperexcitación, puede desempeñar una función protectora ante los incrementos de excitabilidad.

## **Capítulo I**

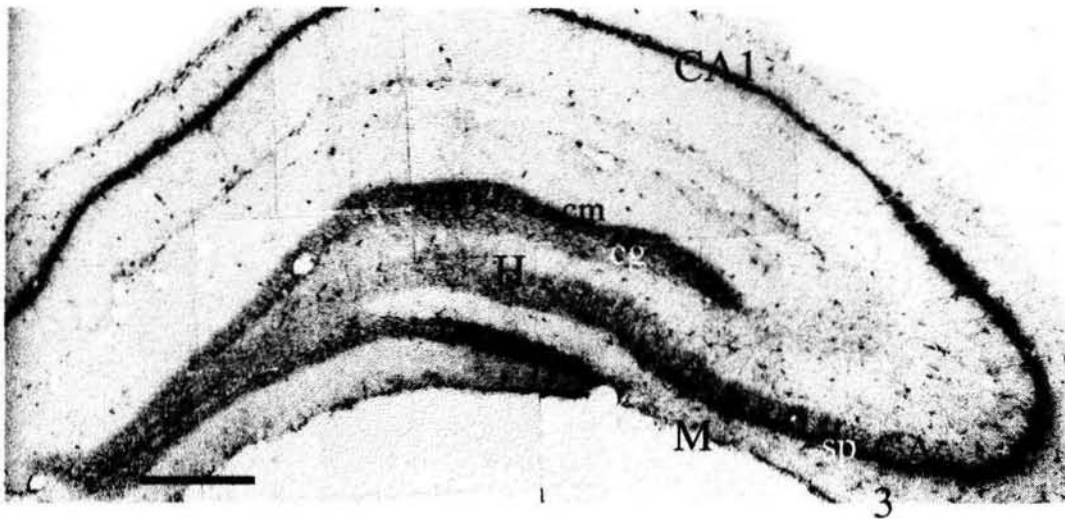
### **ANATOMIA DEL HIPOCAMPO**

#### **1.1 Introducción.**

El hipocampo es una estructura del sistema límbico que, en conjunto con el giro dentado, el subiculum, presubiculum, parasubiculum y la corteza entorrinal constituyen la formación hipocámpal.

Se ha demostrado que el hipocampo está relacionado en procesos de aprendizaje y memoria (Scoville y Milner, 1957), y posee una alta susceptibilidad a presentar actividad epileptiforme en comparación con cualquier otra área del cerebro (Green, 1964).

Según Ramón y Cajal (1911), el hipocampo puede ser dividido en dos grandes regiones, que denominó como región inferior y superior. Posteriormente Lorente de Nó en 1934 lo dividió en tres campos designados como CA que significa “cuerno de Ammon” (CA1, CA2 y CA3). Los campos CA1 a 3 abarcan la zona piramidal y el campo CA4, la región ocupada por la capa polimórfica del giro dentado, o hilus.



**Figura 1.** Fotomicrografía del hipocampo, que muestra la distribución de las regiones y capas celulares. GD, giro dentado; cm, capa molecular; cg, capa granular; h, hilus (capa polimórfica); FM, fibras musgosas; cp, capa piramidal (Tomada y modificada de Ramírez y Gutiérrez, 2001)

## 1.2 Tipos celulares principales

Las células principales del giro dentado son las células granulares y las del hipocampo propiamente dicho son las piramidales. Además, existen diferentes tipos de interneuronas intrínsecas de cada región.

## 1.3 Células granulares

El giro dentado está formado por tres capas: la principal o de células granulares, la capa molecular, que se localiza sobre la capa granular y una capa difusa de células polimórficas, llamada hilus (Johnston y Amaral, 1998).

Las células granulares son pequeñas (aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) y de forma esférica, y se encuentran acomodadas en una capa de 4 a 6 células de grosor. Las dendritas de las células granulares se extienden perpendicularmente de la capa granular hacia la capa molecular donde se reciben las conexiones sinápticas procedentes de la corteza. Los axones de las células granulares son llamados fibras musgosas (FM), por la apariencia de sus terminales sinápticas. Estas se originan de la porción basal del cuerpo de la célula, y se extienden dentro de la capa polimórfica o hilus (Johnston y Amaral, 1998), donde hacen sinapsis sobre células musgosas y otras interneuronas. Finalmente, forman un haz de fibras que conforman el *stratum lucidum* de CA3.

Los axones de las FM tienen tres tipos diferentes de terminales sinápticas con sus blancos en el hilus y en el área CA3: a) botones gigantes de las FM, b) pequeñas terminales en “*passant*”, y c) extensiones filopoidales (Ramón y Cajal 1911; Blackstad y Kjaerheim, 1961; Amaral, 1979; Claiborne y col. 1986; Chicurel y Harris, 1992). Los botones gigantes forman sinapsis con las células musgosas hilares y las dendritas proximales de las células piramidales de la zona CA3. Los botones gigantes de las FM miden de 4 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y contienen pequeñas vesículas claras de aproximadamente 40 nm y vesículas grandes de centro denso. El cuerpo principal del botón cubre una gran espina postsináptica llamada excrescencia espinosa, que sobresale de la dendrita proximal de las células hilares y de las células piramidales de CA3 (Amaral y Dent, 1981; Acsády y col., 1998). Cada FM hace aproximadamente 140-150 contactos con células del hilus, estas células son principalmente interneuronas inhibitorias, aunque las colaterales de una sola célula granular hace aproximadamente 10 sinapsis con células musgosas hilares excitadoras. En el área

CA3, cada FM hace de 11-18 sinapsis con células piramidales y de 40-50 sinapsis por cada FM con todos los tipos de interneuronas que tienen dendritas en el *stratum lucidum* (Frotscher, 1985; Acsády y col. 1998). Las extensiones filopoidales y las terminales en “*passant*”, que se extienden de los botones gigantes de las FM, hacen sinapsis con las interneuronas, y son más pequeñas que las asociadas a las células piramidales y no forman sitios de liberación múltiples (Cajal, 1911; Amaral y Dent, 1981; Acsády y col. 1998). Las células granulares, además de contener glutamato como neurotransmisor, contienen y liberan neuropéptidos. Los botones gigantes de las fibras musgosas contienen dinorfina (Mc Ginty y col 1983), encefalina (Commns y Milner, 1996), Colecistoquina CCK (Chandy y col. 1995), Neuropéptido Y NPY, (Marksteiner y col., 1990) Neuroquinina B (Schwarzer y Sperk, 1995), ATP- adenosina (Terrian y col. 1989) y zinc (Amaral y Dent, 1981).

#### **1.4 Células piramidales:**

Los cuerpos celulares de las neuronas piramidales son cónicos, de 20- 40  $\mu\text{m}$  en la base y de 40-60  $\mu\text{m}$  de altura y están arreglados en una capa ordenada de 3 a 6 células de grosor llamado *stratum pyramidale*. Estas neuronas tienen árboles dendríticos elaborados que se extienden perpendicularmente a la capa celular en ambas direcciones.

Las dendritas apicales son más largas que las basales y se extienden desde el ápice de la célula piramidal hacia el centro del hipocampo atravesando tres capas: el *stratum lucidum*, el *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum-moleculare*. Las dendritas reciben diferentes tipos de contactos sinápticos en cada una de estas capas. Las dendritas basales se extienden desde la base del cuerpo celular hacia el borde del hipocampo y forman el *stratum oriens*, (O'Keefe y col., 1978).



Las dendritas de las neuronas piramidales de CA3 están cubiertas con espinas, donde se forman las sinapsis con las fibras musgosas (Johnston y Amaral, 1998). Las células piramidales de CA3 son glutamatérgicas y proyectan a la zona CA1 por la vía llamada colaterales de Schaffer.

### **1.5 Interneuronas:**

Aproximadamente el 10% de la población neuronal del hipocampo son interneuronas (Olbrich y Braak, 1985). Estas tienen un axón que carece de espinas y liberan ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Recientemente se ha demostrado que las interneuronas presentan una diversidad superior a la que se suponía. (Buckmaster y Soltesz, 1996).

En el giro dentado, el tipo de interneuronas más importante son las células en canasta. Estas se localizan en la base del giro dentado formando una hilera continua. Los axones de estas interneuronas inervan a los somas de las células granulares. Se han descrito al menos cinco tipos diferentes de células en canasta (Ribak y Seress, 1983). Además, pueden ser aún subdivididas con base en la presencia de proteínas de unión a calcio y neuropéptidos (Freund y Buzsáki, 1996).

En la capa molecular del giro dentado se localizan interneuronas que reciben información de la vía perforante y que, a su vez, hacen contactos axo-axónicos sobre el segmento inicial del axón de las células granulares (Kosaka, 1983; Freund y Buszaki, 1996). Existe también una gran variedad de interneuronas que se localizan en la capa polimórfica y algunas de

estas neuronas tienen axones que permanecen en la capa polimórfica, mientras que otras inervan a las capas granular y molecular (Freund y Buzsáki, 1996).

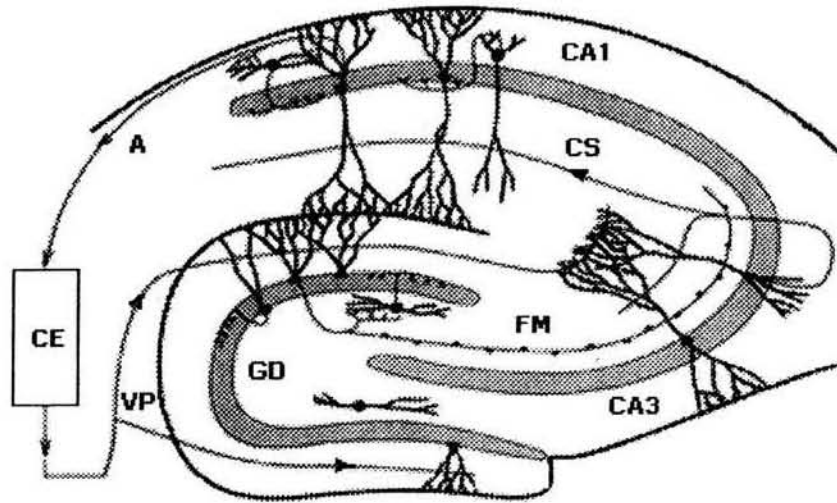
Existe una clase de células intrínsecas excitadoras que se localizan en la capa polimórfica, las células musgosas (Amaral, 1978). Estas proyectan a la capa molecular del giro dentado en forma ipsilateral y contralateral.

Las interneuronas del hipocampo que se localizan en la capa piramidal, o cerca de ella, son clasificadas en tres grupos con base en sus blancos sinápticos: a) células axo-axónicas, b) células en canasta y c) células biestratificadas (Freund y Buzsáki, 1996). Estas células hacen sinapsis sobre los segmentos iniciales de las neuronas piramidales y ejercen un fuerte control sobre el inicio de los potenciales de acción. Las células en canasta hacen sinapsis sobre el soma de las células piramidales. Cada célula en canasta puede establecer múltiples contactos sobre una neurona piramidal formando lo que parece como una canasta dentro de la cual se encuentra el soma. Finalmente las células biestratificadas hacen contactos sinápticos sobre las dendritas basales y apicales de las neuronas piramidales y otras interneuronas, aunque existe una pequeña superposición entre sus regiones blanco, debido a que las dendritas de los tres tipos de células proyectan dentro del *stratum radiatum* y *stratum oriens* (Buhl y col., 1996; Halasy y col., 1996). Muchas interneuronas GABAérgicas contienen y liberan además péptidos neuroactivos como péptido vasoactivo intestinal VIP, somastotatina y Neuropeptido Y (Freund y Buzsáki 1996). Las conexiones inhibitoras comúnmente sincronizan a las interneuronas produciendo oscilaciones de varias frecuencias, incluyendo teta (5-7 Hz) y gamma (40 Hz) (Freund y Buzsáki, 1996).

### **1.6 Circuito trisináptico del hipocampo:**

La organización funcional del hipocampo ha sido tradicionalmente descrita a partir un circuito trisináptico. Andersen y colaboradores en 1971 demostraron que la estimulación de la corteza entorrinal genera la activación de una cadena neuronal que incluye a todos los tipos celulares principales de la formación hipocampal: células granulares del GD y neuronas piramidales de la región CA3 y CA1, así como interneuronas.

La entrada cortical más importante al hipocampo proviene de las neuronas localizadas en la capa II de la corteza entorrinal, que dan origen a las fibras que forman la vía perforante. Esta entra a la formación hipocampal, cruza la fisura hipocampal y el subiculum y termina en la capa molecular del giro dentado y en la región CA1 del hipocampo. La siguiente sinapsis de este circuito, es la formada por las células granulares del giro dentado con las células piramidales de la zona CA3. Los axones de las células granulares forman la proyección de las fibras musgosas que atraviesan el hilus hacia la zona CA3, donde hacen sinapsis con las dendritas proximales de las células piramidales y con las interneuronas intrínsecas. A su vez, las células piramidales de la zona CA3 proyectan sus axones, o colaterales de Schaffer, hacia la zona CA1, donde inervan también a células piramidales e interneuronas. Por último, de la región CA1 proyectan las conexiones hacia el subiculum y a la corteza entorrinal. Figura 2.



**Figura 2. Esquema representativo del circuito trisináptico básico del hipocampo. La estimulación de la corteza entorrinal evoca la activación de una cadena neuronal de células principales e interneuronas. CE, Corteza entorrinal; VP, Vía perforante, GD, Giro dentado; FM, Fibras musgosas; CA3 y CA1, Cuerno de Ammon de la región 1 y 3; CS, Colaterales de Schaffer; A, Alveus. (Tomado y modificado de Amaral y Witter, 1995).**

Además de las conexiones sinápticas entre las diferentes regiones de la formación hipocámpal, existen también interacciones sinápticas complejas dentro de cada región. Estos circuitos locales consisten, por lo menos, de una neurona principal y una célula en canasta inhibitoria asociada, pero también puede incluir sinapsis excitadoras recurrentes. El sistema de excitación recurrente está especialmente presente en la región CA3 (Johnston y Brown, 1981; Miles y Wong, 1986) y está formado por axones colaterales de las neuronas piramidales que proyectan hacia sus vecinas. Las neuronas piramidales de la región CA3 también reciben una profusa inervación de las interneuronas (Miles y Wong, 1987; Griffith y col., 1986). Estimaciones basadas en registros pareados realizados en rebanadas de

cerebro transversales sugieren que cada célula piramidal está inervada por más de 15 interneuronas inhibitorias (Miles y Wong, 1987).

El patrón de conexiones aferentes y eferentes de las distintas regiones sugiere que la región CA3 es el principal integrador de la formación hipocámpal (Swanson y Cowan, 1977). Este es el intermediario entre la entrada de información al giro dentado y la salida del hipocampo, por lo que ha propuesto que el giro dentado funciona como un filtro limitando la transferencia de información de la corteza entorrinal a la capa piramidal del hipocampo (Heinemann y col., 1992).

## **Capítulo II. ÁCIDO $\gamma$ - AMINO BUTÍRICO (GABA)**

### **2.1 Generalidades**

El ácido  $\gamma$ - aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitor más abundante en el sistema nervioso central.

Se considera que el GABA es capaz de actuar como metabolito, factor neurotrófico, y neurotransmisor. Este aminoácido, no proteico se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y, fuera de éste, en varios tejidos periféricos especialmente, en los islotes de las células  $\beta$  pancreáticas (Rorsman y col., 1989).

La síntesis de GABA se lleva a cabo por medio de una sola reacción catalizada por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) utilizando como sustrato al L- glutamato.

### **2.2 Isoformas de la GAD**

Se han caracterizado dos isoformas de la enzima GAD que difieren en su peso molecular, localización intracelular, interacción con su cofactor fosfato de piridoxal (PLP), así como el mecanismo de regulación de su síntesis (Martin y Rinvall, 1993). La primera evidencia científica de que existen dos isoformas de la GAD y de que éstas difieren en la interacción

con el PLP fue descrita en los años 70, aún antes de que fueran caracterizadas molecularmente (Bayon y col. 1977, Tapia y Sandoval. 1971).

La primera isoforma de la GAD, la GAD67, fue obtenida del cerebro del gato y está formada por 593 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 66,600 (Kaufman, y col. 1986; Kobayashi y col 1987.)

El cADN para la segunda isoforma de la GAD, la GAD65, fue obtenido de tejido cerebral de rata y humano (Erlander y col. 1991; Bu y col. 1992), y está compuesta por 585 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 65 400 D (Chang y Gottlieb, 1988).

Cada uno de los genes de estas dos isoformas están ampliamente conservados entre los vertebrados y muestran más del 95% de identidad entre las secuencias de aminoácidos de gato, rata, ratón y humano (Kaufman y col., 1986; Kobayashi y col.,1987; Julien y col.,1990; Katarova y col.,1990; Bu y col.,1992). Sin embargo, las GAD 65 y 67 difieren considerablemente en su secuencia de aminoácidos en una misma especie (con sólo el 65% de identidad).

La localización intracelular de las dos isoformas de la GAD también difiere y se ha propuesto que esta compartimentalización puede tener un significado fisiológico. La GAD67 se localiza principalmente en los somas celulares y la GAD65 en terminales. Aunque las dos isoformas son capaces de sintetizar GABA, la GAD65 parece estar más comúnmente asociada con las sinapsis y su ARNm está presente en niveles elevados durante periodos de sinaptogénesis activa y durante el desarrollo del estriado y cerebelo

(Greif y col., 1991). Los hallazgos que muestran que la GAD65 se encuentra predominantemente en las sinapsis han sugerido la hipótesis de que la GAD65 podría estar presente en las proyecciones de las neuronas con grandes axones, mientras que la GAD67 se encuentra principalmente en interneuronas. Con base en esta correlación se ha sugerido que las dos isoformas de la GAD poseen papeles distintos en los diferentes tipos de sinapsis (Feldblum y col., 1993). Por ejemplo, las neuronas con axones cortos tienden a tener una amplia arborización dendrítica y establecen comúnmente sinapsis dendrodendríticas, mientras que las neuronas con axones largos están más involucradas en las sinapsis axosomáticas o axodendríticas. La distribución del ARNm de las dos GAD en el bulbo olfatorio, ganglios basales y septum lateral apoyan esta hipótesis. Sin embargo, en el hipocampo, donde existe una gran diversidad morfológica de interneuronas GABAérgicas, se encuentra el ARNm de las dos isoformas y la pérdida de una obvia correlación entre los relativos niveles de los ARNm de las dos isoformas y la morfología es inconsistente con la hipótesis inicial (Feldblum y col., 1993).

Con base en la alta concentración de GABA en los cuerpos neuronales y en las diferencias de distribución intracelular de GAD65 y GAD67, se ha sugerido que la GAD67 podría estar más involucrada en la síntesis de GABA para la actividad metabólica, mientras que la GAD65 está involucrada en la síntesis de GABA utilizado en la transmisión sináptica (Martin y Rinvall, 1993).

La anatomía de las vías GABAérgicas en el sistema nervioso central ha sido dilucidada no solo por la inmunotinción a GAD, sino también se ha utilizado inmunohistoquímica para GABA y GABA-T (GABAaminotransferasa, enzima que inactiva al GABA).



Recientemente se ha descrito un nuevo marcador molecular (VGAT) que confiere un fenotipo GABAérgico a la célula.

Usando los procedimientos inmunohistoquímicos para marcar GAD, GABA y VGAT, (Mc Laughlin y col., 1974; Saito y col., 1974; Mugaini y Oertel, 1985), se han identificado los principales grupos celulares y vías GABAérgicas y se estima que del 10% al 40% de las terminales nerviosas de la corteza cerebral, hipocampo y sustancia nigra utilizan al GABA como neurotransmisor (Fonnum, 1984).

### **2.3 Regulación de la síntesis de GABA:**

La síntesis de GABA es un proceso altamente regulado en el cerebro. Diversos estudios con sinaptosomas y rebanadas de cerebro, además de mediciones "in vivo", han demostrado que la síntesis puede ser estimulada o suprimida por manipulaciones fisiológicas o farmacológicas (Chapman y Evans, 1983; Giorgi y Meek 1984; Paulsen y col., 1988; Battaglioli y Martin, 1990; Loscher y col., 1991).

La localización de la GAD65 en las terminales nerviosas y la gran reserva de apoGAD65 (forma inactiva de la enzima) sugieren que la GAD65 se especializa en responder a cambios a corto plazo que demandan el neurotransmisor. Los niveles de apoGAD y de la holoenzima GAD (holoGAD, enzima activa) son controlados por un ciclo de reacciones que son reguladas fisiológicamente por concentraciones de ATP y otros polianiones y por fosfato inorgánico. Esto sugiere la posibilidad de que la actividad de la GAD se encuentre unida a la actividad neuronal a través del metabolismo energético (Martin y Rimvall, 1993).

La GAD no se encuentra saturada por el glutamato en sinaptosomas o en rebanadas corticales, sin embargo, no existe evidencia de que la síntesis de GABA "in vivo" se regule fisiológicamente por la disponibilidad de glutamato (Martin y Rimvall, 1993).

La modulación de la síntesis de GABA ocurre tanto a corto como a largo plazo. La interacción de la GAD con su cofactor PLP es un proceso altamente regulado que juega un papel importante en la regulación a corto plazo de la actividad de la GAD (Martin y Rimvall, 1993). La regulación de la GAD a largo plazo es compleja y numerosos estudios indican que los niveles de la proteína GAD y la expresión de sus genes pueden ser regulados de muchas formas, incluyendo mecanismos transcripcionales y postrcripcionales (Szabo y col., 1996). El GABA podría ser capaz de regular la expresión de GAD67 a nivel postrricional, así como el nivel de proteína GAD67 pero no de ARNm (Martin y Rimvall, 1993). Las diferencias en la regulación de las dos isoformas de la GAD y en su actividad indican que podrían estar involucradas en procesos diferentes de neurotransmisión mediada por GABA (Soghomonian y Martin, 1998).

#### **2.4 Relación GABA y epilepsia**

La conservación del balance entre la excitación y la inhibición de la actividad neuronal es esencial para el mantenimiento de las funciones normales del sistema nervioso central. La alteración en el balance de excitación-inhibición es uno de los factores que tienen más importancia en la etiología de la epilepsia, donde el GABA tiene un papel central

(Schousboe, 1990). La inhibición de la síntesis de GABA así como la administración de antagonistas al receptor GABA<sub>A</sub> producen crisis convulsivas (Tapia, 1975).

Tanto en la epilepsia del lóbulo temporal como en diversos modelos experimentales de epilepsia se han detectado alteraciones en la inhibición mediada por GABA. Existe una extensa literatura sobre el papel del GABA en la generación de crisis convulsivas. Por ejemplo en humanos, monos y ratas se detectó una disminución de los niveles de GABA, así como de la GAD, y también se observa una reducción del número de terminales GABAérgicas (Schmidt y col, 1981; Houser y col., 1986).

Inhibidores de la degradación de GABA como son el  $\gamma$ -vinil-GABA y el ácido aminooxiacético bloquean la propagación de crisis convulsivas (Iaradola y Gale, 1980; La salle y col., 1983). Además, antagonistas a los receptores GABA como la picrotoxina y la bicuculina inducen crisis (Meldrum, 1984; Lloyd, 1986). Por otro lado, se ha descrito que el método de epileptización conocido como kindling genera un incremento y no una disminución de GABA, y se ha demostrado un aumento de la inhibición recurrente mediada por GABA en las células granulares del giro dentado (Maru, y Goddard, 1987).

La disminución de la inmunorreactividad a GAD en las interneuronas del hilus asociada al kindling parece ser solo transitoria (Babb et al., 1989). Además, se ha reportado un incremento a largo plazo en la actividad de la GAD en diversas áreas cerebrales después de la inducción de crisis por la administración intraperitoneal de ácido kainico (agente convulsivante). Los ratones transgénicos deficientes del gen que codifica para la GAD67

tienen niveles reducidos de GABA y mueren durante el primer día de vida, al parecer de un paro respiratorio (Kash y col., 1997). En contraste, los ratones deficientes en el gen de la GAD65 son viables, y conservan los niveles de GABA y GAD67 normales, pero presentan una alta susceptibilidad a presentar crisis y estas son tan severas que ocasionan la muerte (Asada y col., 1996).

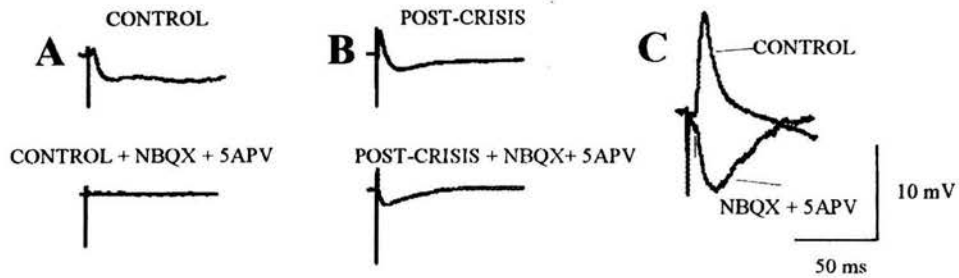
## **2.5 Papel del GABA durante el desarrollo**

Durante el desarrollo embrionario, el GABA aparece antes de la sinaptogénesis de las fibras inhibitoras y se ha propuesto que sirve como factor neurotrófico y de diferenciación neuronal (Lipton y Kater 1989; Meirer et al. 1991; Lauder 1993, Katarova 2000). En la mitad del tiempo de la gestación de la rata y ratón las fibras GABAérgicas crecen cerca de las zonas donde las neuronas están siendo generadas (Lauder y col. 1986; Del Rio y col. 2000). La expresión espacio-temporal de ciertas subunidades del receptor GABAA coincide con la aparición de estas vías GABAérgicas. (Laurie y col. 1992; Ma y Baker 1995). El GABA puede ser liberado de las fibras y conos en crecimiento por excitación u otros mecanismos (Taylor y Gordon, 1991). La presencia concomitante de fibras GABAérgicas, mecanismos de liberación de GABA y sus receptores en las primeras etapas de la vida embrionaria sugieren que el GABA funciona como un factor trófico durante la neurogénesis (Barker y col. 1998).

### Capítulo III.

#### **Transmisión Glutamatérgica y GABAérgica simultánea en la sinapsis formada por las células granulares y neuronas en CA3**

El hallazgo de GABA y GAD67 en las células granulares y en las fibras musgosas permitió proponer la hipótesis de que estas células podían usar GABA como neurotransmisor. Las primeras evidencias electrofisiológicas que apoyan esta hipótesis fueron obtenidas al registrar respuestas glutamatérgicas y GABAérgicas simultáneas en las células piramidales de la zona CA3 al estimular el GD, después de producir crisis convulsivas generalizadas (Gutiérrez, 2000; Gutiérrez y Heinemann, 2001). Normalmente las respuestas sinápticas de las células piramidales a la estimulación del GD son bloqueadas por antagonistas a los receptores al glutamato, debido a que la respuesta excitadora rápida es monosináptica y las respuestas inhibitoras son polisinápticas. Sin embargo después de producir crisis convulsivas generalizadas (CCG) *in vivo* (Gutiérrez, 2000; Gutiérrez y Heinemann, 2001) o potenciación a largo plazo por la estimulación a alta frecuencia del GD *in vitro* (Gutiérrez 2002), los antagonistas glutamatérgicos bloquean el potencial postsináptico excitador (PPSE) evocado en las células piramidales por la estimulación del GD y permanece un potencial postsináptico inhibitor rápido (PPSI), que es bloqueado por bicuculina. Este PPSI tiene la misma latencia que el PPSE control y no se altera al perfundir un medio extracelular con bajo calcio, lo que indica que, a diferencia de los animales sanos, la transmisión GABAérgica en este sistema, después de la inducción de hiperexcitabilidad, es monosináptica. (Figura 3).



**Figura 3.** Transmisión GABAérgica y glutamatérgica simultánea en células de la zona CA3 del hipocampo. **A)** Los potenciales excitatorios e inhibitorios son bloqueados por antagonistas a receptores a glutamato en preparaciones control. **B)** Después de inducir CCG, los antagonistas glutamatérgicos bloquean en PPSE y aíslan un PPSI que tiene la misma latencia que el PPSE registrado en situación control (**C)** (Tomado de Gutiérrez, 2000).

Además se determinó que la presencia de esta respuesta inhibitoria es transitoria, ya que si este experimento se realiza un mes después de la última crisis convulsiva, esta respuesta no se observa.

Esta hipótesis de coliberación de glutamato y GABA de las fibras musgosas es apoyada por otras evidencias acumuladas por medio de diversas aproximaciones experimentales. Se ha demostrado que las células granulares glutamatérgicas contienen cantidades apenas detectables de GABA y GAD67 (la enzima limitante para su síntesis), en condiciones normales (Sandler y Smith, 1991; Sloviter y col., 1996), pero la estimulación de la vía perforante (Sloviter y col., 1996) y la inducción de crisis convulsivas (Lehman y col., 1996; Ramírez y Gutiérrez, 2001) producen una sobreexpresión de la enzima. Más aún, después de una serie de crisis convulsivas inducidas por ácido kaínico, las células granulares también sobreexpresan transitoriamente ARNm para la GAD (Schwarzer y Sperk, 1995).

Recientemente, Ramírez y Gutiérrez (2001) observaron con estudios inmunohistoquímicos que las células granulares y las FM sobreexpresan GAD 67 de manera dependiente de la actividad. Es decir, una crisis convulsiva induce su sobreexpresión en las FM y varias crisis convulsivas o la estimulación *in vitro* del GD durante 3 horas con un protocolo de estimulación de alta frecuencia, que no produce actividad epiléptica, inducen su incremento en los somas de las células granulares. Así, se demostró que el patrón temporal de la expresión de GAD 67 difiere en la capa de células granulares y las FM, dependiendo del tiempo que el sistema esté sujeto a hiperexcitación (Ramírez y Gutiérrez, 2001).

Por otro lado, para que un neurotransmisor pueda ser liberado es necesario que sea incorporado a las vesículas en la zona de liberación. Recientemente, Lamas y col. (2001) demostraron por primera vez la presencia del ARNm del transportador vesicular para GABA (VGAT) en las células granulares, donde el ARNm es expresado también de manera dependiente de la actividad en las terminales de las FM y en el GD.

Sin embargo la coliberación de GABA y glutamato de las FM parece no ser exclusiva de preparaciones sometidas a periodos de hiperexcitación. Recientemente se encontró que la transmisión de GABA de las FM está normalmente presente en preparaciones de cobayos jóvenes, donde se demostró con registros de fijación de voltaje la existencia de potenciales GABAérgicos monosinápticos al activar las FM (Walker y col 2001).

## Capítulo IV

### 4.1. JUSTIFICACIÓN

Como ya se menciona, las células granulares del giro dentado normalmente liberan glutamato sobre las interneuronas y las células piramidales localizadas en la región CA3 del hipocampo. Sin embargo, éstas contienen normalmente cantidades apenas detectables de GABA y GAD67 en sus terminales. La presencia de crisis convulsivas o la inducción de hiperexcitabilidad *in vitro*, y la estimulación del giro dentado produce una sobreexpresión de GAD67 y GABA en las células granulares y sus FM. Estos cambios parecen subyacer las respuestas sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas simultáneas de corta latencia en las células de CA3 evocadas por la estimulación de las células granulares. Esto indica que estas células son capaces de liberar glutamato y GABA simultáneamente en respuesta a un incremento de excitabilidad. Posteriormente fue comprobado que, el ARNm del VGAT también se sobreexpresa de manera dependiente de actividad. Estos datos apoyan la idea de que las células granulares tienen la maquinaria para la síntesis y liberación de GABA. Sin embargo la determinación del ARNm de VGAT en el GD se realizó en homogenizado de tejido, por lo que podría existir un aporte de este ARNm por otros tipos celulares, es por esto necesario determinar la presencia ARNm de VGAT en los somas de las células granulares. Además, existe otra interrogante. Los estudios de la regulación de la expresión de GAD por la inducción de hiperexcitabilidad han mostrado que la GAD67 es la isoforma que sufre modificaciones.



Por otro lado, recientemente se ha descrito que la transmisión GABAérgica del giro dentado a CA3 se presenta normalmente en animales jóvenes, sin la necesidad de generar crisis convulsivas o de sobreestimar el giro dentado (Walker y col., 2001; Gutiérrez y col., 2003). Esto sugiere, que posiblemente la transmisión GABAérgica se manifiesta en forma dependiente de la edad, es decir, que normalmente se presente en animales en desarrollo y que desaparezca en los animales adultos, a menos que se sobreestime el sistema. Por lo que es necesario determinar si los marcadores GABAérgicos también se expresan y dejan de hacerlo de la misma manera. Con base en estos antecedentes, planteamos las siguientes:

#### **4.2. HIPÓTESIS**

- Si las células granulares liberan GABA en respuesta al incremento de excitabilidad, y si el GABA es sintetizado por la GAD65, entonces se detectará la presencia de ARNm de GAD65 en estas células en condiciones basales y posibles modificaciones en su expresión de acuerdo con incrementos de excitabilidad.
  
- Ya que el transportador vesicular de GABA (VGAT) es indispensable para que este aminoácido pueda ser liberado, entonces se detectará la presencia y expresión del ARNm del VGAT en las células granulares, al tiempo que esté presente la transmisión GABAérgica inducida de las fibras musgosas sobre CA3.
  
- Si como sucede con las ratas adultas, la aparición de transmisión inhibitoria de las células granulares sobre CA3, después de la inducción de hiperexcitabilidad, coincide con un

aumento en la inmunorreactividad de GAD67 en las terminales de las fibras musgosas, deberemos corroborar la presencia de GAD67 en las terminales de las fibras musgosas de animales jóvenes en condiciones control, ya que éstas liberan GABA sin necesidad de inducir un estado de hiperexcitabilidad.

#### **4.3. Objetivos Generales:**

- Caracterizar el efecto que tienen los cambios de excitabilidad del sistema nervioso sobre la expresión de ARNm de GAD65 y VGAT en las células granulares del hipocampo de rata por medio de la técnica de RT-PCR e hibridación *in situ*.
- Caracterizar la expresión de las proteínas GAD67 y GAD65 en las terminales de las fibras musgosas de ratas jóvenes, donde se observa liberación GABAérgica, en
- condiciones normales.

#### **4.4. Objetivos específicos:**

- Determinar la expresión de ARNm de GAD65 y VGAT en las células granulares de animales control
- Analizar si existen modificaciones en la expresión del ARNm de GAD65 y VGAT en las células granulares animales epileptizados por el método de kindling.

- Analizar la expresión de GAD67 y GAD65 en las terminales de las fibras musgosas de ratas jóvenes y compararla con la de animales adultos.

## **Capítulo V. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realizaron experimentos de RT-PCR *in situ*, hibridación *in situ* y de la combinación de estos dos métodos en el hipocampo de ratas Wistar. Se utilizaron ratas macho de 250 a 300g de peso, mantenidas en condiciones controladas de temperatura y luz, con agua y alimento sin restricción. Se contrastó la expresión de ARNm de GAD65 y VGAT en las células granulares del giro dentado de ratas control y de ratas epileptizadas por el método de "kindling".

### **5.1 Procedimiento para el método de epileptización, kindling**

El método de epileptización conocido como "kindling", palabra que significa encendido, es un modelo de epilepsia experimental que consiste en la estimulación eléctrica o química iterativa del sistema límbico que genera conductas epileptiformes progresivas que culminan en crisis convulsivas generalizadas. El estado epiléptico generado es permanente e implica diversos cambios funcionales y morfológicos (Goddard y col., 1969; Racine, 1972; 1978; Babb y col., 1991; Isokawa, y col., 1993; Represa y col., 1993; Cavazos y Sutula, 1990; Qiao y Noebels, 1993).

## **5.2. Preparación quirúrgica**

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (70 mg/kg) y con la ayuda de un aparato estereotáxico (Kopf) se implantó un electrodo bipolar de acero inoxidable en el núcleo basolateral de la amígdala izquierda del lóbulo temporal (coordenadas AP 2.5; L 5; H 8.5; atlas de Paxinos y Watson, 1996). El electrodo se fijó al cráneo con acrílico dental. Después de la cirugía, las ratas se sometieron a un periodo de recuperación de una semana con administración de antibióticos (formizina 0.1 ml 1000UI, i.p. y terramicina 20 mg/kg v.o.) para evitar infecciones.

## **5.3. Protocolo de estimulación eléctrica**

Transcurrido el periodo postoperatorio, se fijó el umbral de estimulación eléctrica que se define como la intensidad mínima de estimulación que puede provocar una postdescarga electroencefalográfica en la estructura cerebral estimulada y cambios conductuales observables que pueden ser: inmovilidad o cierre del ojo ipsilateral (guiño). A partir del día siguiente, los animales se estimularon diariamente con la intensidad umbral determinada para cada uno (ca 500  $\mu$ A) con un tren de pulsos rectangulares de 1 ms de duración durante un segundo a 60 Hz. Los cambios conductuales producidos por la estimulación diaria, a lo largo del proceso, se evaluaron según la escala conductual descrita por Racine (1972). Los animales epileptizados por el método de kindling fueron estimulados hasta obtener 5 crisis convulsivas generalizadas (CCG).

#### **5.4. Grupos experimentales:**

Para su estudio los animales fueron separados de la siguiente forma:

- 1) Grupo control-I: 4 ratas que no fueron implantadas y que no recibieron ningún tratamiento.
  
- 2) Grupo kindling-II: 4 ratas que se implantaron con un electrodo en amígdala izquierda y que se estimularon hasta generar cinco crisis generalizadas. Los animales se procesaron 24 horas después de la última crisis.

#### **5.5. Diseño de los oligonucleótidos**

Usamos los oligonucleótidos específicos para GAD65, reportados por Ruano y col. (2000), y cuya secuencias son 5'CCTTTCCTGGTGAGTGCCACAGCTGGAACC3' y 5'TTTGAGAGGGCGGCTCATTCTCTCTTCATTG3'. Para el transportador vesicular de GABA (VGAT) usamos los oligonucleótidos sentido y antisentido reportados por McIntire y col. (1997) 5'ATTCAGGGCATGTTCGTGCT3' y 5'ATGTGTGTCCAGTTCATCAT3',

#### **5.6. Preparación del tejido para la detección del ARNm**

Los animales fueron anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico (Anestosal 50 mg/kg i.p.) y se decapitaron rápidamente. Los cerebros fueron extraídos e incluidos en medio para ser cortados (Tissue freezing medium Jung Leica) en un criostato (Leica

1850). Se obtuvieron cortes de 10  $\mu\text{m}$  de grosor que fueron adheridos sobre portaobjetos impregnados con el adhesivo "*superfrost*" (VWR 48311-703 ).

### **5.7 RT- PCR *in situ***

Los cortes se lavaron por 10 minutos con PBS a 4 °C y se fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos durante 30 minutos. Se lavaron nuevamente 2 veces por 10 minutos para eliminar el exceso de paraformaldehído (Sigma). Posteriormente se realizó un tratamiento con detergente Triton X-100 (Sigma) 0.25% en PBS durante 30 minutos para permeabilizar la membrana y para eliminar las proteínas adheridas al ADN. Se incubó a 37°C durante toda la noche con la misma solución en presencia de DNAsa (Roche) para hacer una digestión y destruir todo el ADN. Además, esta solución contenía un inhibidor de RNAsa (Invitrogen) para evitar que las RNAsas se activaran y destruyeran el RNA de nuestro interés. Un corte, en cada experimento, no fue incubado en DNAsa y fue tomado como control positivo. Al día siguiente se inactivó la DNAsa con una solución de EGTA (20mM en H<sub>2</sub>O) durante 10 minutos, después en PBS con glicina 3% por dos minutos y por último en PBS solo durante 2 minutos.

El siguiente paso fue la reacción RT-PCR. Los cortes de tejido fueron cubiertos con 50 $\mu\text{l}$  de la solución siguiente:

H<sub>2</sub>O 23  $\mu\text{l}$ , Buffer 5X EZ (Perkin Elmer)10  $\mu\text{l}$ , DNTPs: dGTP 1.5  $\mu\text{l}$ , dATP 1.5  $\mu\text{l}$ , dCTP 1.5  $\mu\text{l}$ , dTTP 1.5  $\mu\text{l}$  (200 $\mu\text{M}$  cada uno) dUTP- acoplado a digoxigenina (200 $\mu\text{M}$ ), RTth (Perkin Elmer),5 unidades 2  $\mu\text{l}$ , Mn(Oac) 2.5  $\mu\text{l}$  (25  $\mu\text{M}$ ), Oligo1 (0.45 $\mu\text{M}$ ), Oligo 2

(0.45 $\mu$ M).

Un corte por cada experimento fue incubado en ausencia de los oligonucleótidos específicos (control negativo). Posteriormente fueron cubiertos con cubreobjetos y se sellaron con aceite mineral. Las laminillas se pasaron al termociclador PCR Express Thermal cycler HYBAID para hacer la amplificación. Las secuencias de ADNc para VGAT fueron amplificadas con 30 ciclos.

Posteriormente los cubreobjetos fueron retirados de las laminillas con xilol y los cortes se rehidrataron gradualmente con alcohol a diversas concentraciones: 100% durante 10 min y dos minutos en cada uno de las siguientes diluciones 96%, 80%, 70%, 50% 30%, agua y PBS. Una vez rehidratados, se incubaron durante 60 minutos en suero de cabra 5%, BSA 1% y Triton X-100 0.3% a temperatura ambiente para evitar el pegado inespecífico del anticuerpo. Después de un lavado con PBS, se incubaron los cortes con el anticuerpo para digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina, durante toda la noche a temperatura ambiente (1:100 en PBS; Roche) y suero total de cabra (3%). Después de lavar 2 veces durante 10 minutos con PBS se llevó a cabo la reacción de revelado. Esta se realizó mediante la incubación del tejido por 20 minutos en 400 $\mu$ l de NBT y BCIP (Roche; una pastilla disuelta en 10 ml de agua, concentración de NBT 0.4 mg/ml y BCIP 0.19 mg/ml).



### **5.8.USO COMBINADO DE RT- PCR E HIBRIDACIÓN *IN SITU***

La técnica de RT-PCR *in situ* permite la localización anatómica de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Debido a su alta sensibilidad permite detectar cantidades mínimas de ARNm conservando la arquitectura histológica de la preparación analizada (Nouvo 1997, Muro -Cacho, 1997) ya que unas cuantas copias de ARNm presentes en la célula pueden amplificarse hasta obtener la señal deseada. Esta técnica, usada en combinación con la hibridación *in situ*, presenta grandes ventajas y ha demostrado ser eficaz para la caracterización de la expresión génica, ya que conjunta las ventajas de ambas técnicas. Así, inicialmente puede amplificarse el ADNc de interés que normalmente está presente en muy baja concentración, y posteriormente puede detectarse por medio de la hibridación *in situ* que es menos sensible si se utiliza sola. Con base en lo anterior, cuando se procesaron las muestras con ambas técnicas, primero se realizó la amplificación y posteriormente se hibridó con la sonda marcada con digoxigenina, que a su vez fue detectada por medio de la reacción enzimática, que se describe con detalle a continuación.

### **5.9. Hibridación *in situ***

#### **Preparación y síntesis de las sondas para VGAT.**

Se diseñó una sonda de RNA marcada con digoxigenina. El vector que se utilizó fue el pcDNA3 (vector comercial proporcionado por la Dra. Claudia Treviño del IBT-UNAM) al cual se le insertó el segmento de VGAT extraído por PCR. Los oligonucleótidos de VGAT que se utilizaron para la reacción de PCR son altamente específicos (Lamas y col., 2001). Estos reconocen específicamente el ADNc y no el ADN genómico, debido a que la secuencia del oligonucleótido para VGAT se localiza entre dos exones. La secuencia que se obtuvo por PCR al amplificar con 30 ciclos usando los oligonucleótidos anteriores se

purificó y se cortó con las enzimas de restricción adecuadas (información obtenida del banco de datos) que permitieron insertar el segmento elegido y del tamaño deseado de VGAT en el plásmido. Se comprobó que efectivamente se incorporaran los segmentos de 95 pb y 397 pb de VGAT al correr una muestra digerida con enzimas de restricción en un gel de agarosa y posteriormente se linearizó el plasmido pcDNA3 que fue usado como molde para la reacción de transcripción y marcaje de la sonda. La construcción se muestra en la figura 4.

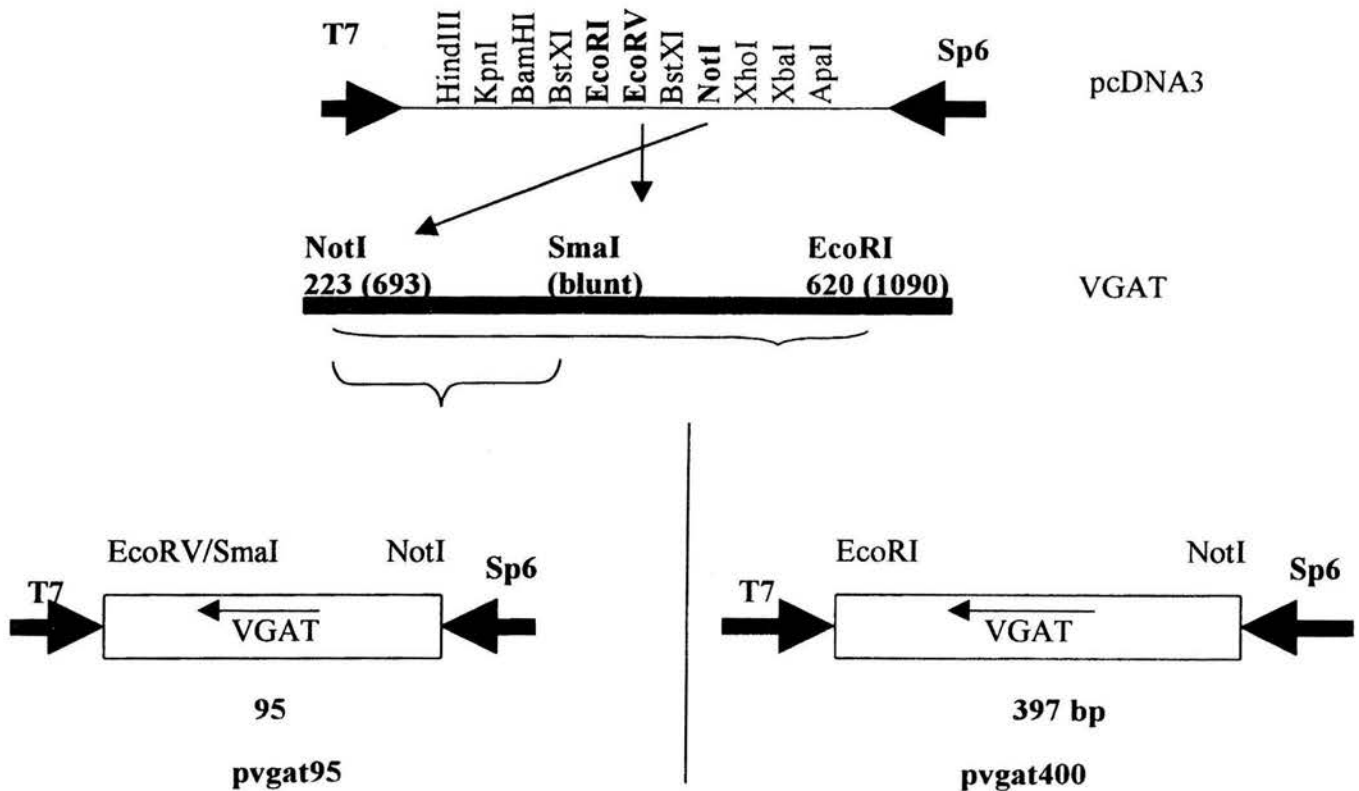


Figura 4. Esquema donde se muestra el sitio inserción de los dos segmentos 95 y 397 pb de VGAT en el vector pcDNA3 indicando los cortes y las enzimas de restricción .

### **5.10 Síntesis y marcaje de la sonda.**

Una vez que se realizó la linearización del plásmido, éste se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el marcaje y síntesis de la sonda, que se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (DIG RNA labeling Mix, Roche 1277 073). Este contiene todos los elementos necesarios para la transcripción de los segmentos de VGAT de 95 y 397 pb. Debido a que se utilizan dos polimerasas diferentes (SP6 y T7), y como estas enzimas sintetizan secuencias en sentidos opuestos, se obtienen dos secuencias: sentido y antisentido. La secuencia antisentido de la sonda marcada es complementaria al ARNm de las células. La secuencia sentido es utilizada como control negativo. Una vez realizada la extracción del RNA, la concentración de la sonda marcada se determinó por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

Se ajustaron diluciones de sonda marcada de VGAT a una concentración de  $0.44\text{ ng}/\mu\text{l}$  para realizar la hibridación *in situ*.

### **5.11. Hibridación *in situ***

Al igual que en la técnica de RT-PCR se obtuvieron cortes de  $10\ \mu\text{m}$  de grosor de cerebros de ratas control, que fueron adheridos sobre las laminillas impregnadas con el adhesivo *superfrost plus (VWR)*. Los cortes se lavaron por 10 minutos con PBS a  $4^{\circ}\text{C}$  y se fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en un contenedor con hielo. Se lavaron nuevamente 2 veces por 10 minutos para eliminar el exceso de paraformaldehído. Posteriormente se lavaron en PBS-Triton/ Buffer de hibridación 1:1 durante 10 minutos. Después las laminillas se incubaron con el buffer de hibridación (50% de formamida/ 50% de SSC 2X/  $500\ \mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN proveniente de esperma de salmón/ 10% de Tween-20) durante 1 hora a  $50^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente, a 200µl de buffer de hibridación se le agregó 50 ng de la sonda marcada para VGAT. (Esta solución se desnaturalizó elevando la temperatura hasta 80°C durante 5 minutos y se colocó en hielo hasta su uso). Las laminillas se incubaron durante toda la noche a 55°C en una cámara húmeda y los cortes fueron cubiertos con Hybri-slips (Sigma) para evitar la evaporación de la solución de hibridación. Los Hybri-slips fueron retirados con buffer SCC 1x y los cortes se lavaron con SSC 0.1x durante 30 minutos, dos veces, y con PBS 0.1 M durante 10 minutos. Para bloquear el pegado inespecífico del anticuerpo, los cortes se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente en una solución de suero de cabra 5%/ BSA 1% y triton X-100 0.3% en PBS. Después de un lavado en PBS, se realizaron los mismos pasos para revelar la reacción de RT- PCR *in situ* (descrita en párrafos anteriores). La concentración del anticuerpo para digoxigenina fue de 1:800.

#### **5. 12. Análisis:**

Los cortes se analizaron con un microscopio invertido (Axiovert-100 Zeiss). La marca densa, producto de la reacción enzimática se destaca sobre el fondo claro. Los resultados se ilustran con fotomicrografías en blanco y negro obtenidas a diversos aumentos con una cámara fotográfica digital Sony Cyber Shot DSC-S75.

### **5.13. Inmunofluorescencia para GAD67**

Se utilizaron 3 ratas Wistar de 15 días de edad y 3 de ratas de 2 meses de edad. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital y perfundidos vía intracardíaca con paraformaldehído al 4% en PB pH 7.4. Posteriormente se extrajo el cerebro y se colocó en una solución de sacarosa al 30% en PBS durante 24 horas. Una vez equilibrado el cerebro se cortó coronalmente en un criostato (LEICA, CM 1850) y las rebanadas de 30µm de grosor se colectaron en PBS. La inmunohistoquímica se realizó por libre flotación. Los cortes fueron lavados con PBS pH 7.4 e incubados en la solución para bloquear el pegado inespecífico (10% de suero normal/1% de gelatina 0.3% de tween20 en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se incubaron con el anticuerpo primario antiGAD67 (Chemicon AB5992) 1:1000 y suero normal de caballo 5% en PBS durante 36 horas a 4°C. Posteriormente fueron lavados 4 veces durante 10 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo. Después se incubaron en el anticuerpo secundario anti-conejo (Vector FI-1000 acoplado a FITC) 1:400 durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se lavaron 4 veces por 10 minutos. Por último se montaron los cortes con Vectashield (Vector H-1000) y se colocó un cubreobjetos. El análisis se realizó en un microscopio confocal BioRad MRC 600.

#### **5.14. Inmunohistoquímica para GAD65**

Se lavaron los cortes de 30  $\mu$  de grosor durante 15 minutos en PBS, posteriormente se incubaron en una solución de 0.3%, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena durante 10 minutos. Se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS y después se incubaron en la solución de bloqueo (10% de suero normal de caballo, 1% de gelatina y 0.3 % de triton x-100). Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo monoclonal a una dilución 1:100 (Boehringer Mannheim ) en PBS y 5% de suero, durante 36 horas a 4°C con agitación constante. Se lavaron los cortes 4 veces durante 10 minutos y después se incubaron con el segundo anticuerpo anti mouse IgG biotinilado (Jackson Immuno Res) en una dilución 1:200. Los cortes se lavaron 4 veces por 10 minutos y se procesaron con el Kit ABC (Vectastain, Vector, Labs.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron 4 veces por 10 minutos y se reveló. Los cortes se incubaron por 10 minutos en la solución de revelado diaminobenzidina (DAB Sigma) 10 mg / 25 ml PBS 10 mM y sulfato de níquel (30%) La reacción enzimática se detuvo con agua destilada. Finalmente, los cortes se montaron sobre los portaobjetos y se cubrieron con resina entellan (Merck). Las preparaciones se analizaron con un microscopio invertido (Axiovert-100 Zeiss). La marca densa producto de la reacción enzimática se destaca sobre el fondo claro.

## Capítulo VI. RESULTADOS

### 6.1. RT-PCR *in situ*

#### 6.1.2. Experimentos Control

Con este tipo de experimentos es necesario incluir diversos controles que garanticen la especificidad de la técnica, debido a que pueden sufrir contaminación por diversas fuentes. En este apartado se describen los diversos controles realizados.

##### 6.1.2 Controles negativos

Para cada experimento se procesó en paralelo un corte que sirvió como control negativo para determinar que la marca obtenida fuera específica para los oligonucleótidos usados. Estos experimentos control se realizaron para cada par de oligonucleótidos y en ellos la reacción de RT-PCR se llevó a cabo sin la inclusión de los oligonucleótidos. Esto impide que la ADN polimerasa sintetice el producto, por lo que no se obtiene señal en el tejido. Lo anterior se observa en la figura 5.

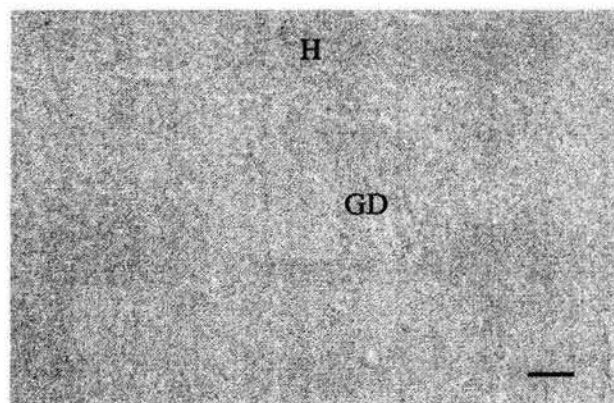


Figura 5. Control negativo sin oligonucleótidos. Fotomicrografía de un corte coronal de hipocampo mostrando el giro dentado (GD) e hilus (H), procesado para RT-PCR *in situ* en ausencia de oligonucleótidos. Nótese la ausencia de tinción. Barra 25µm.

En el siguiente tipo de experimento control, la incubación se realizó sin la adición del anticuerpo (antidigoxigenina), por lo que hay ausencia de marca en las células y solo se

observa una señal de fondo, intrínseca de la técnica. Esto se realizó en 4 cortes, uno para cada par oligonucleótidos. Esto se muestra en la figura 6.

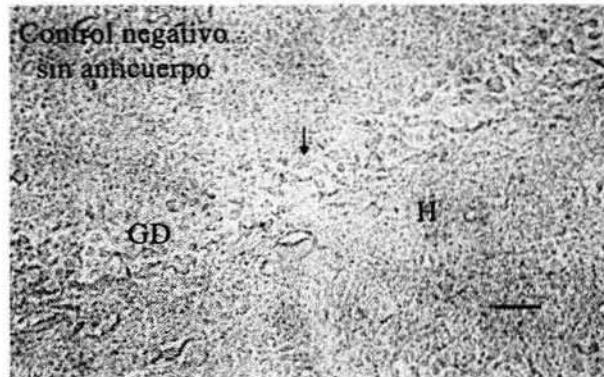


Figura 6. Control negativo sin anticuerpo. Fotomicrografía de un corte coronal de hipocampo de rata, procesado para RT-PCR in situ en ausencia de anti-digoxigenina. Nótese la ausencia de marca. Se muestra el giro dentado (GD) e hilus (H) Barra 25 $\mu$ m.

### 6.1.3. Controles Positivos

Una forma de confirmar que se produce la incorporación de nucleótido marcado al ADN es incubar un corte en ausencia de DNAsa. En los cortes incubados en ausencia de DNAsa todas las células presentan marca debido a que los diversos mecanismos involucrados en la reparación de ADN endógeno están intactos y además los oligonucleótidos pueden amplificar la señal de ADN presente en la célula. Esto se observa en la figura 7, en este experimento en el que se utilizaron oligonucleótidos específicos para GAD 65.



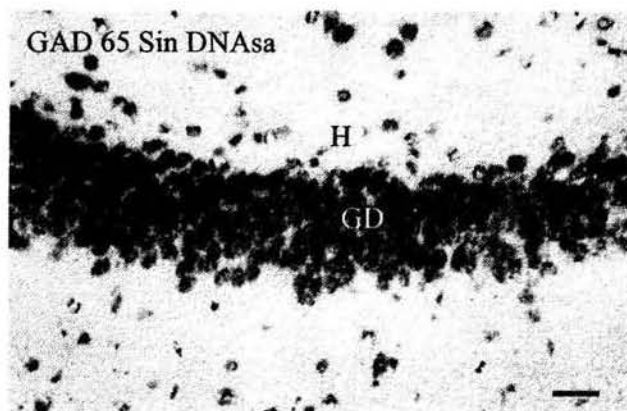


Figura 7. Control positivo en ausencia de DNAsa. Fotomicrografía de un corte de hipocampo de rata procesado para RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para GAD65, pero en ausencia de DNAsa. Se muestra una sección del giro dentado (GD) e hilus (H) donde se observa la marca del DNA genómico en todas las células. Barra 25µm.

En estas mismas condiciones, pero agregando oligonucleótidos específicos para VGAT, se observa el mismo patrón de tinción. La presencia de marca en todas las células indica que el procedimiento de permeabilización celular se realizó correctamente y los reactivos necesarios para la amplificación y marcaje del ADN pudieron acceder correctamente al interior celular. Figura 8.

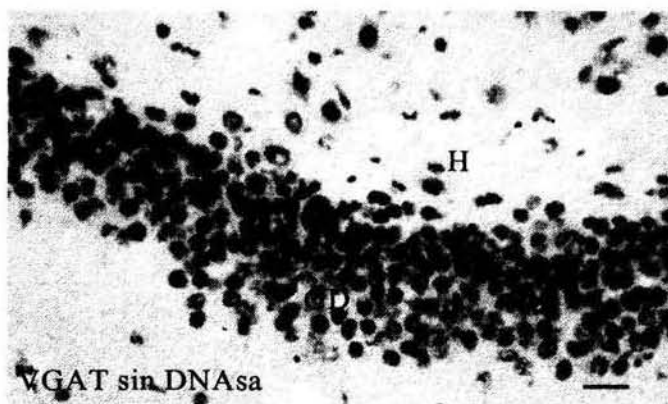


Figura 8. Control positivo en ausencia de DNAsa. Fotomicrografía de hipocampo de rata procesado para RT-PCR en ausencia de DNAsa usando oligonucleótidos específicos para VGAT. Nótese una señal intensa en todos los núcleos celulares. Barra 25µm.

## 6.2. Grupos experimentales

### 6.2.1. Grupo Control

En los cortes incubados en presencia de DNAsa, debe observarse una señal específica que indica la expresión del ARN en estudio. En este caso, el ADN es destruido y solo se conserva el ARNm que por transcripción reversa, se convierte en el ADNc que sí es amplificado y que por lo tanto puede ser detectado. En estas condiciones, usando oligonucleótidos para GAD 65, se observó una señal positiva en células de la corteza (tejido usado como control debido a que existen poblaciones GABAérgicas). Se procesaron 8 cortes y se observa consistencia en la marca. Figura 9.

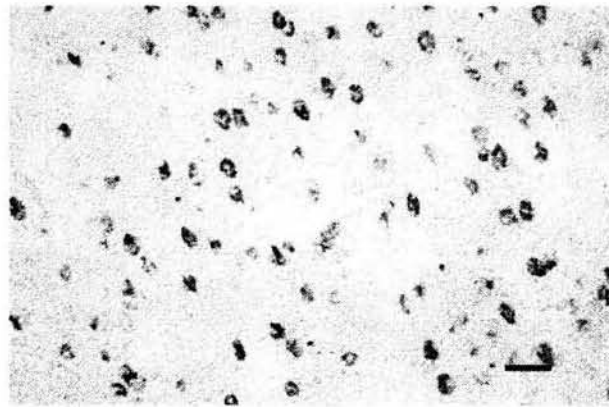


Figura 9. Control positivo para ARNm para GAD65 en la corteza frontal. Fotomicrografía de una zona de la corteza frontal procesada para RT-PCR in situ. Nótese marca en interneuronas GABAérgicas donde se localiza el ARNm para GAD 65. Barra 25µm.

También, bajo las mismas condiciones, y usando oligonucleótidos para GAD 65, se observó una señal positiva en las células granulares, identificadas así por su forma, casi esférica, el tamaño de su núcleo y su localización, y en algunas interneuronas, que presentan un mayor tamaño celular y se localizan en el hilus. Se procesaron 4 cortes.(Figura 10).

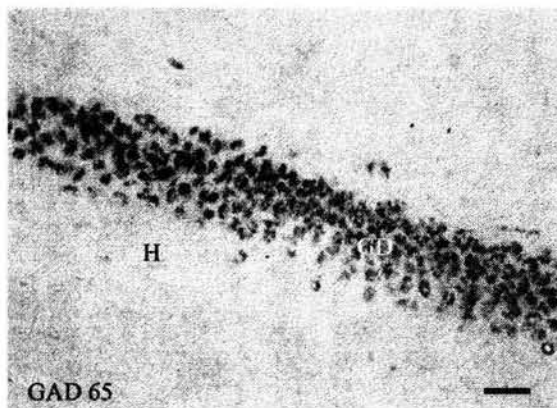


Figura 10. Fotomicrografía de una región del giro dentado (GD) de una rata control procesado para RT-PCR *in situ* con oligonucleótidos para la GAD 65, con 30 ciclos de amplificación. La señal específica en las células granulares y algunas interneuronas muestran que contienen el RNAm de GAD65. Barra 25µm.

La localización de ARNm es principalmente citoplásmica y, en contraste cuando la RT-PCR se realiza en ausencia de DNAsa, la señal se observa principalmente en el núcleo. Este, es un criterio que confirma la especificidad de la técnica (figura 11).

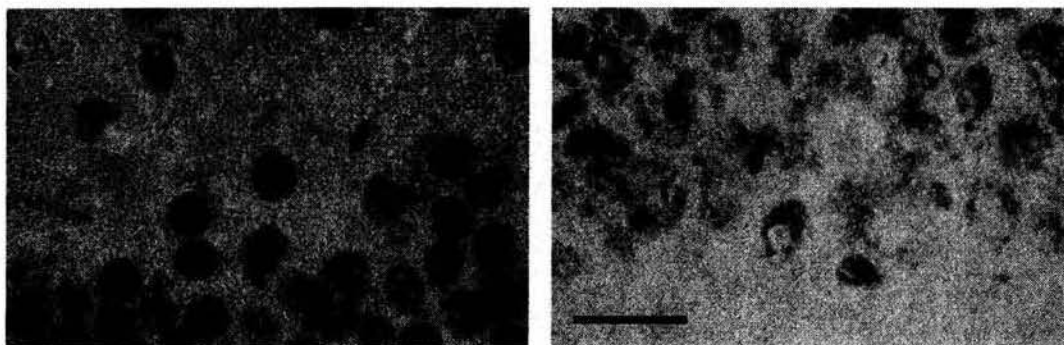


Figura 11. Fotomicrografías del giro dentado procesadas para RT-PCR *in situ* usando oligonucleótidos para GAD65 sin DNAsa (en A) y con DNAsa (en B). En A, se observa la marca en toda la célula, principalmente en el núcleo. En B, que corresponde a una preparación incubada en presencia de DNAsa, la marca se restringe al citoplasma. Esto indica la reacción exclusivamente con RNAm. Barra 25µm.

Los experimentos para la detección de ARNm de VGAT se realizaron inicialmente con 20 ciclos de amplificación pero la señal no fue detectada posiblemente debido a que este ARNm es escasamente expresado en las células granulares. Sin embargo, al aumentar el

número de ciclos a 30 (se procesaron 8 cortes) se pudo detectar la marca en algunas células granulares e interneuronas. (figura 12).

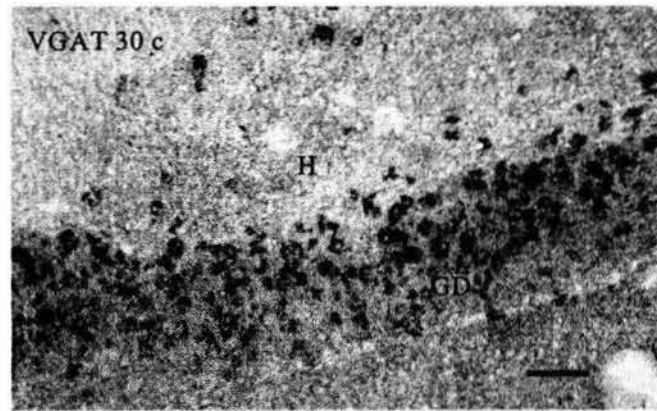


Figura 12. Fotomicrografía de una región del giro dentado de rata control procesado para RT-PCR *in situ* con oligonucleótidos para VGAT. La reacción de PCR se llevó a cabo con 30 ciclos. Puede observarse que algunas células granulares e interneuronas contienen RNAm de VGAT. Barra 25µm.

En la corteza también se observan células GABAérgicas marcadas cuando se realiza la RT-PCR *in situ* usando oligonucleótidos específicos para VGAT. Figura 13.

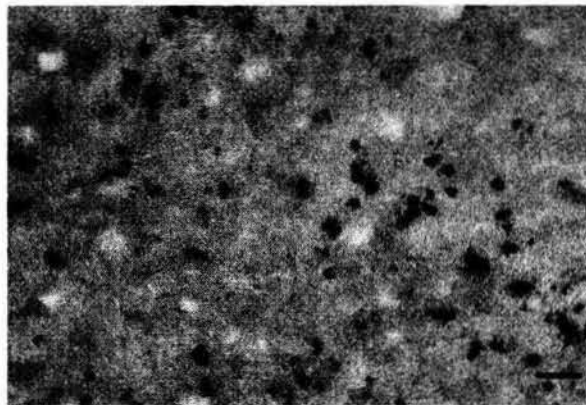


Figura 13 Fotomicrografía de una región de la corteza frontal procesado para RT-PCR *in situ* con oligonucleótidos para VGAT. Nótese que las interneuronas contienen RNAm de VGAT. Barra 25µm.

### 6.3. RT-PCR *in situ*

#### 6.3.1. Grupo Experimental ratas con crisis convulsivas (kindling)

Se procesaron simultáneamente ratas que presentaron al menos 5 crisis convulsivas y ratas control ( 4 cortes de cada condición observándose consistencia en los resultados). Cuando se realizó la RT-PCR usando los oligonucleótidos de GAD65 se observó marca en las células granulares (células esféricas localizadas en la capa del giro dentado) y en interneuronas, (figura 14). En la figura 15 se muestra una figura compuesta de las dos condiciones y no observó una diferencia de expresión de GAD65 entre el grupo control y los animales epilépticos. Esto concuerda con lo que ha sido previamente reportado usando la técnica de hibridación *in situ*.

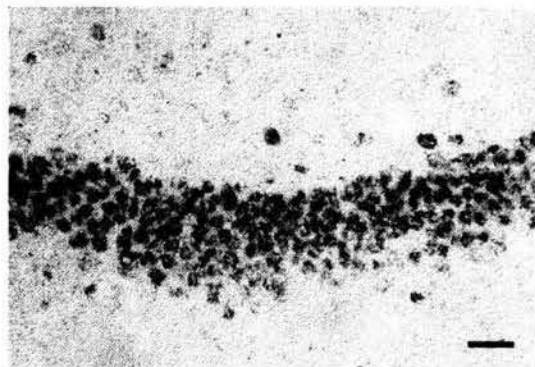


Figura 14. Fotomicrografía de una zona del giro dentado (GD) e hilus (H), de un corte proveniente de una rata epiléptica, procesado para RT-PCR *in situ* con oligonucleótidos para GAD 65. La marca en las células granulares e interneuronas muestra que ambos tipos celulares contienen RNA para GAD65. Barra 25 $\mu$ m.

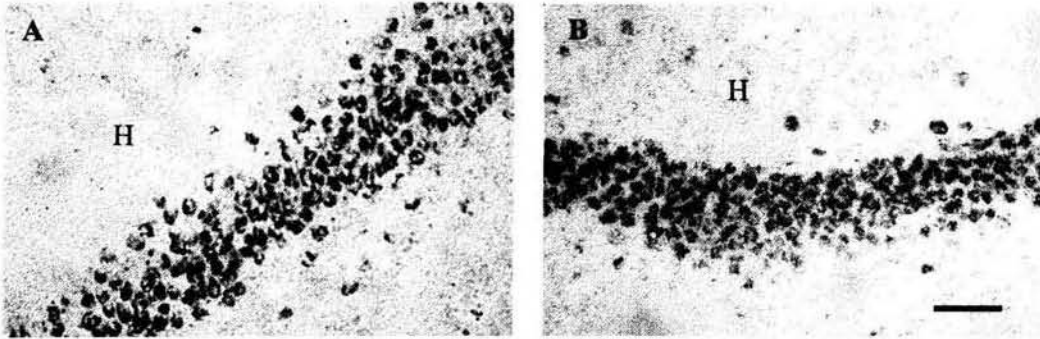


Figura 15. Comparación de la expresión de RNAm de GAD 65 en el giro dentado (GD) de una rata control (A) y una rata epiléptica (B). Nótese que no existe diferencia en su expresión entre los grupos. Barra 25 $\mu$ m.

Los experimentos de RT-PCR *in situ* usando los oligonucleótidos de VGAT (realizados en ratas epilépticas) fueron inconsistentes y no fue posible el obtener resultados confiables, por lo que decidimos realizar RT-PCR en combinación con la hibridación de una sonda de RNA acoplada a digoxigenina (ver material y método). Los resultados obtenidos de esta serie de experimentos se describen en el siguiente apartado.

### 6.3.2. Hibridación *in situ*

La utilización combinada de RT-PCR e hibridación *in situ*, proporciona las ventajas que poseen las dos técnicas por separado, es decir, una alta sensibilidad y especificidad. Primero se realizó la técnica de hibridación *in situ* aislada, usando sondas marcadas con digoxigenina que reconocen específicamente secuencias de VGAT. De los dos tamaños de sondas usados 95 pb y 397 se eligió la de 95 pb debido a que obtuvimos experimentalmente una mejor marca. En la figura 16 se muestra un corte proveniente de un cerebro de rata control incubado con la sonda sentido de 95 pb. En éste control negativo no se observa ninguna marca, debido a que no existen secuencias complementarias de ARNm en las células.

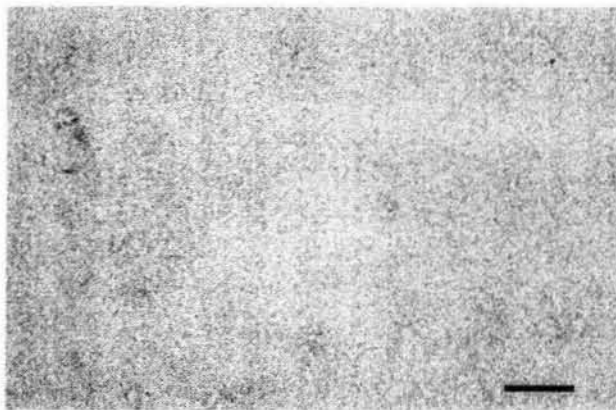


Figura 16. Control negativo con una sonda "sentido". Fotomicrografía de un corte coronal de corteza cerebral. Este corte fue procesado con la técnica de Hibridación *in situ* con la sonda "sentido" (95 pb) para VGAT. Como era esperado, nótese la ausencia de marca. Barra 25 $\mu$ m

En contraste, en los cortes incubados con la sonda de 95 pb antisentido se observa señal en las células GABAérgicas de la corteza. Figura 17

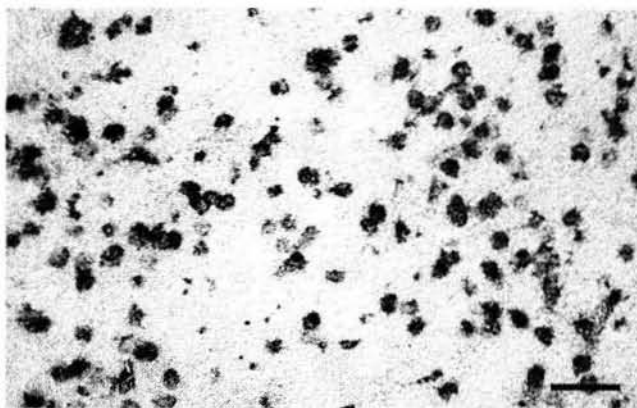


Figura 17. Fotomicrografía de una región de la corteza cerebral procesada con la técnica de Hibridación *in situ* con la sonda "antisentido" para VGAT. En este caso, se observa marca específica en interneuronas de la corteza. Barra 25 $\mu$ m

Al realizar solamente la hibridación *in situ* con la sonda para VGAT, las células granulares no presentan marca, como previamente había sido reportado, pero sí se observa en el soma las interneuronas localizadas en el hilus. Figura 18.

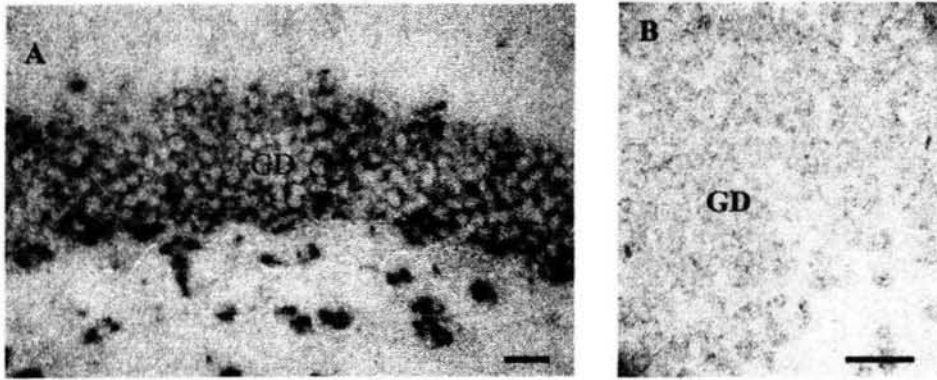


Figura 18. En A fotomicrografía de una región del GD y B acercamiento de las células granulares de una rata control procesado para Hibridación *in situ* con la sonda antisentido para VGAT. Nótese la marca en algunas interneuronas y la ausencia de tinción en las células granulares, Barra 25µm.

#### 6.4. Técnica combinada de RT-PCR e hibridación *in situ*

Habiendo establecido la técnica de hibridación *in situ*, la siguiente fase consistió en realizarla en combinación con la RT-PCR. La amplificación por PCR se realizó primero con 40 ciclos y después llevamos a cabo la hibridación con la sonda de ARNm marcada. En las preparaciones provenientes de animales con al menos 5 crisis, se observa una intensa marca o expresión de ARNm que codifica para VGAT en las células granulares e interneuronas (identificadas como tales con base en los criterios, de tamaño, forma y localización, ya descritos) Se procesaron 12 cortes y se observó consistencia de la marca entre ellos. Figura 19.



Figura 19. Fotomicrografía de una región del giro dentado (GD) e hilus (H) de un corte proveniente de una rata epiléptica procesada con la combinación de las técnicas para RT-PCR e Hibridación *in situ* con la sonda "antisentido" para VGAT. Nótese la marca en las células granulares, y las interneuronas, que demuestra que ambas expresan el rna del transportador. Barra 25µm.



Este mismo incremento de densidad de marca se observó en las células GABAérgicas de la corteza, analizada en los mismos cortes. Figura 20.

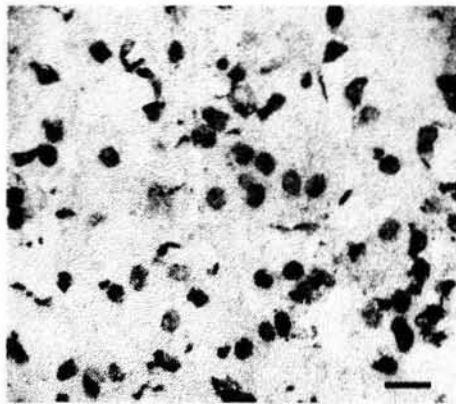


Figura 20. Fotomicrografía de la corteza cerebral procesada con la combinación de las técnicas de RT-PCR e Hibridación *in situ* usando la sonda "antisentido" para VGAT. Las interneuronas GABAérgicas presentan marca para VGAT mRNA. Barra 25µm.

En la figura 21 se puede observa una figura compuesta donde se comparan los resultados obtenidos usando oligonucleótidos específicos para VGAT procesados para RT-PCR *in situ* y amplificando 20 ó 30 ciclos, debido a que si se amplifica el DNAc durante 20 ciclos apenas y se detecta, así como el control negativo donde no se incluyeron los oligonucleótidos y por lo tanto no hay señal. La siguiente fila de la figura muestra los resultados obtenidos al realizar la hibridación *in situ* con la sonda de 95 pb antisentido y la sentido en corteza e hipocampo. En la última fila se observan los resultados después de amplificar e hibridar con una sonda de RNAm marcada con digoxigenina.

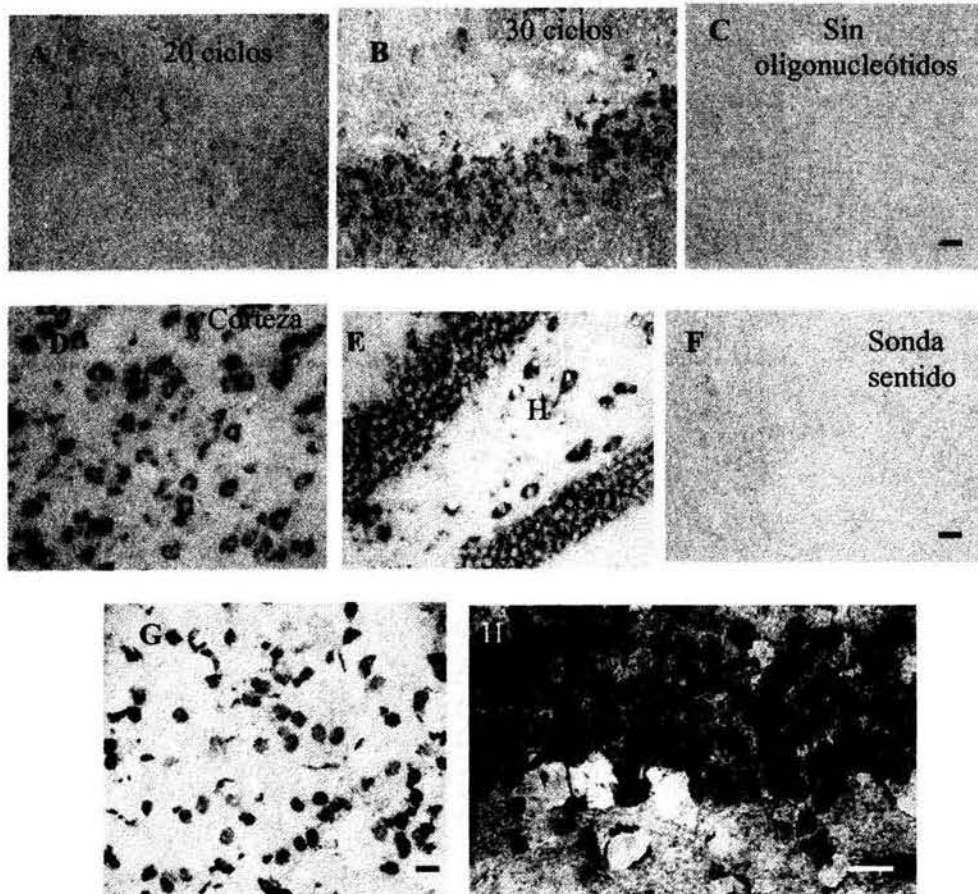


Figura 21. A) Muestra la reacción con oligonucleótidos específicos para VGAT con 20 ciclos de amplificación. Nótese que el RNAm que codifica para VGAT es apenas detectado, en una rata control. En B, la amplificación se realizó con 30 ciclos y, en C, se amplificó con 30 ciclos en ausencia de oligonucleótidos. En la segunda fila se observan preparaciones provenientes de un animal control y procesadas con la técnica de hibridación in situ. D muestra una zona de la corteza cerebral donde se observan interneuronas con marca. En E, se observa la marca en interneuronas del hilus e interneuronas del giro dentado (GD). La figura F muestra un control negativo, incubado con la sonda "sentido". En la tercera fila se muestra los resultados obtenidos al realizar la combinación de RT-PCR (40 ciclos de amplificación) seguida de la hibridación en una rata epiléptica. En estas condiciones se observa una intensa marca en las interneuronas de la corteza cerebral (G) y en las células granulares del giro dentado (H).

## 6.5. Caracterización del fenotipo de las células granulares del giro dentado en diferentes etapas de desarrollo.

### 6.5.1. Inmunofluorescencia para GAD-67.

Los experimentos de inmunohistoquímica se realizaron en ratas de 15 y 40 días de edad. Se analizó la expresión de GAD67 en las terminales de las fibras musgosas de 16 cortes coronales provenientes de 4 ratas de cada edad.

En los animales adultos la inmunorreactividad a GAD67 se restringe a los somas de las interneuronas y sus terminales que inervan a las células piramidales de CA3. Por esta razón los somas de las células piramidales se delimitan por puntos de inmunorreactividad. (Figura 22).

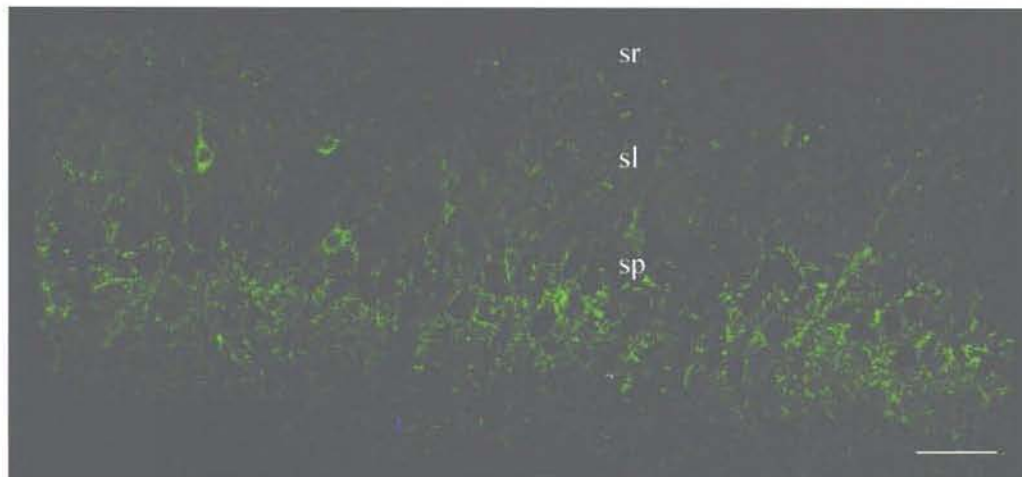


Figura 22. Imagen tomada en un microscopio confocal en la que se muestra la zona CA3 de un corte coronal del hipocampo de una rata adulta en el que se realizó fluorescencia para la inmunodetección de GAD-67. Nótese que solo las interneuronas y sus terminales presentan inmunorreactividad. *so stratum oriens, sp stratum pyramidal, estratum lucidum* sl. La barra equivale a 50µm.

Por el contrario, en el tejido de animales jóvenes de 15 días de edad, se observó inmunorreactividad a GAD67 en el stratum lucidum de la zona CA3 donde se localizan las fibras musgosas. Figura 23.

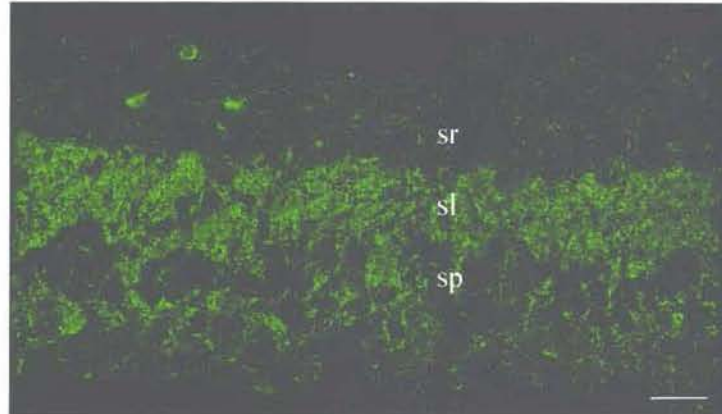


Figura 23. Imagen tomada en un microscopio confocal en la que se muestra la zona CA3 de un corte coronal del hipocampo de una rata de 15 días de edad. Note se la inmunorreactividad en el *estratum lucidum* sl, donde se localiza el tracto de las fibras musgosas y en algunas interneuronas. *so stratum oriens*, *sp stratum piramidal*. La barra equivale a 50  $\mu$ m.

Por el contrario, en el giro dentado no existe diferencia en el número de células granulares inmunorreactivas a GAD67 entre las ratas jóvenes y el control adulto. En ambas condiciones, en esta zona es posible distinguir algunas células granulares marcadas e interneuronas localizadas en la base del giro dentado. Figura 24.

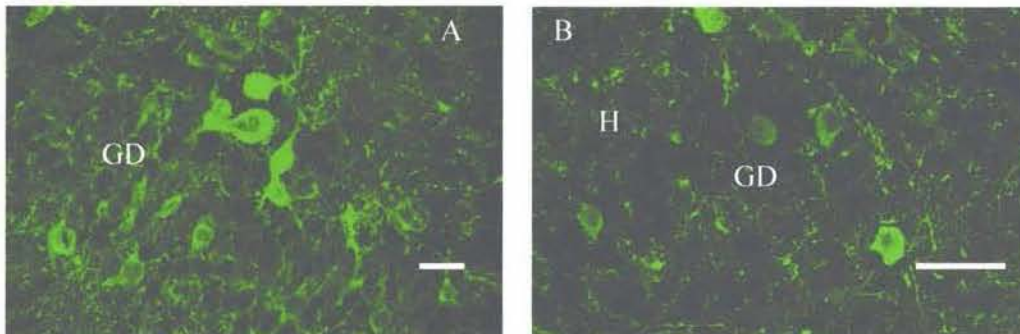


Figura 24. Imágenes obtenidas en un microscopio confocal del giro dentado de una rata adulta (A) y de una rata de 15 días de edad (B). Nótese que la inmunofluorescencia es similar en ambos grupos, en los que se observan algunas células granulares e interneuronas inmunorreactivas a GAD67. La barra equivale a 25  $\mu$ m.

### 6.5.2. Inmunohistoquímica para GAD-65

Al realizar el análisis de expresión de GAD65 en el tejido control y en los animales de 15 días de edad (se procesaron 6 cortes de cada edad) se observó que no existen diferencias de expresión en el número de células inmunorreactivas a GAD65 en el giro dentado Figura 25.

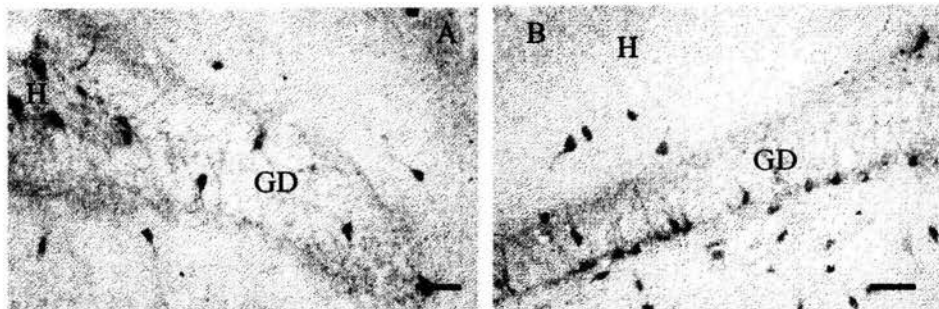


Figura 25. Fotomicrografías de la zona del giro dentado (GD) e hilus (H), de una rata adulta (A) y una rata de 15 días de edad (B), donde se observan algunas células granulares e interneuronas inmunorreactivas a GAD65. La barra equivale a 25 $\mu$ m.

En las terminales de las fibras musgosas que corresponde a el *stratum lucidum*, hay ausencia de expresión de la GAD65 en las ratas jóvenes y adultas. Figura 26.

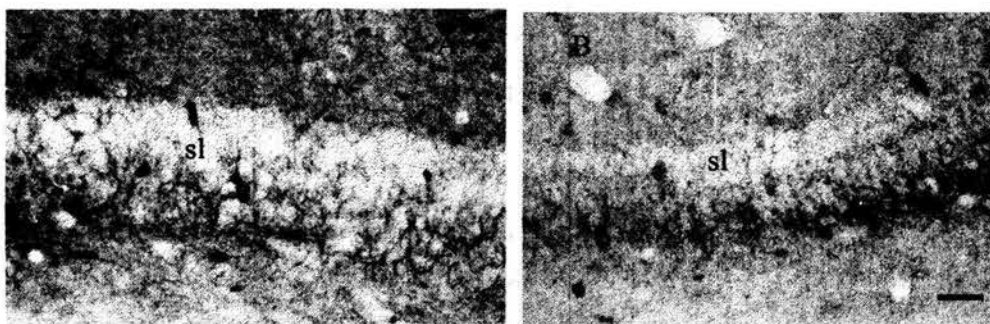


Figura 26. Fotomicrografías de la zona de CA3 de una rata adulta (A) y una rata de 15 días de edad (B), donde se observan algunas interneuronas inmunorreactivas a GAD65 y la ausencia de marca en el *stratum lucidum*. La barra equivale a 25 $\mu$ m.

## Capítulo VII.

### DISCUSIÓN:

Los resultados obtenidos en este trabajo comprueban la expresión del ARNm de VGAT en las células granulares, confirmando resultados previos que uestan la detección del ARNm para VGAT en los sinaptosomas y en el GD (Lamas y col., 2001). Sugerimos que la falta de detección del ARNm y de la proteína de VGAT reportada por otros autores (Chaudhry y col. 1998) se debe a que su expresión es muy baja y el uso de la técnica de inmunohistoquímica carece de suficiente sensibilidad. Sin embargo, con el uso combinado de ambas técnicas, RT-PCR in situ e Hibridación in *situ*, la sensibilidad lograda nos permite observar la expresión de cantidades mínimas de ARNm de VGAT en ratas epilépticas.

Por otro lado, ha sido plenamente demostrada la sobreexpresión de GAD67 y de su ARNm, en las células granulares después de diversas manipulaciones experimentales, como la estimulación de la vía perforante; (Sloviter y col., 1996), la estimulación sináptica de tipo LTP (Gutiérrez 2002), o la inducción de crisis convulsivas por kindling (Ramírez y Gutiérrez 2001), así como el aumento del ARNm de GAD67 por la inyección de un agente convulsivante como el ácido káinico (Schwarzer y Sperk, 1995; Ding y col. 1998; Makiura y col. 1998). Sin embargo, no ha sido explicado por qué esta isoforma de la GAD es la que se incrementa y no la GAD65, que se supone es la responsable de la síntesis de GABA usado como neurotransmisor (Martín y Rinvall, 1993). Se ha descrito que los niveles de GAD65 no se incrementan cuando se estimula la vía perforante (Sloviter y col., 1996) y tampoco cuando se generan crisis convulsivas por la inyección de ácido káinico (Makiura y

col. 1998). Nuestros resultados muestran que existe ARNm de GAD65 en células granulares de animales control, pero, después de generar crisis convulsivas los niveles del ARNm de GAD65 no se modifican. En concordancia, tampoco es posible detectar diferencias en la expresión de la proteína en las células granulares y en sus axones, por medio de técnicas inmunohistoquímicas. Previamente ha sido determinado que los niveles del ARNm de GAD 65 no se modifican después de generar crisis convulsivas (Ding y col., 1998).

La inducción de expresión de GAD67 y no de GAD65 en las células granulares y en sus terminales es consistente con los estudios que muestran que la expresión de las dos isoformas es regulada independientemente (Soghomonian y col., 1992, Rinvall y col., 1993). Además, diversos estudios en otras áreas cerebrales y bajo diferentes manipulaciones experimentales muestran que la GAD67 es más susceptible a regulación por actividad que la GAD65 (Rinvall y Martin 1992, Rinvall y col. 1993, Soghomonian y col 1992, Sloviter y col. 1996, Ramírez y Gutiérrez, 2001, Romijn y col 1994, Ding y col 1998). Sin embargo, queda poco claro por qué la expresión de la GAD67 puede ser inducida y la expresión de GAD65 no.

Con base en las evidencias presentadas por Walker y col. (2001), Gutiérrez (2002) se propuso la hipótesis de que la edad podía ser un factor importante en la expresión del fenotipo GABAérgico de las células granulares. Recientemente, nuestro grupo de investigación determinó que, efectivamente, la transmisión GABAérgica de las FM a CA3 está presente hasta los 22-23 días de edad y cesa al pasar esa edad. (Gutiérrez y col., 2003).

Para determinar si, en paralelo con la transmisión GABAérgica, los marcadores GABAérgicos se expresaban durante el desarrollo y su expresión cesaba al completarse, analizamos la expresión de las dos isoformas de la GAD en ratas jóvenes y la comparamos con la expresión en ratas adultas. Nuestros resultados indican que, efectivamente, existe inmunorreactividad a GAD67 en las terminales de las FM de animales jóvenes, y ésta disminuye gradualmente conforme se completa el desarrollo. Así, en ratas adultas, ésta no es detectable a menos de que se induzca hiperexcitabilidad (Ramírez y Gutiérrez, 2001). En contraste, el análisis de la GAD65 no presenta este patrón de expresión dependiente de la edad, es decir no existen diferencias de inmunorreactividad en las terminales de las fibras musgosas entre una rata joven y una adulta.

Contrariamente a lo descrito en repetidas ocasiones en la literatura es muy posible que la GAD67 participe activamente en la síntesis del GABA sináptico. (Martin y Rinvall, 1992; Rinvall y col. 1993).

Ha sido ampliamente documentada la función del GABA durante el desarrollo (Varju y col. 2001). En el hipocampo se cree que el GABA contribuye a la maduración morfológica de las células de CA3, ya que la liberación GABA de las fibras musgosas coincide con la diferenciación y desarrollo de las espinas y dendritas de las células piramidales (Ben- Ari 2001, Gutiérrez y col. 2003).

Estos resultados muestran que las células granulares expresan un fenotipo GABAérgico durante el desarrollo, que desaparece gradualmente y solo se manifiesta en el hipocampo adulto cuando se genera hiperexcitación.



**REFERENCIAS:**

Acsády, L., Kamondi, A., Sik, A., Freund, T. and Buzsáki, G. 1998. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the hippocampus. *J. Neurosci.* 18: 3386 – 3403.

Amaral, D. G. 1979. Synaptic extension from mossy fibers of fascia dentata. *Anat. Embryol.* 155: 241 – 251.

Amaral, D. G. and Dent, J. A. 1981. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol.* 195: 51 – 86.

Asada H., Kawamura Y.; Maruyama K., Kume H.; Ding R., Yun Ji F., Kanbara N., Kuzume H., Sanbo M., Yagi T., and Obata, K. 1996. Mice lacking the 65kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD 65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochemical and Biophysical Research communications.* 229: 891-895.

Commons, K. G., Milner, T. A. Ultrastructural heterogeneity of enkephalin-containing terminals in the rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 358:324-342, 1996.

Babb T.L., Kupfer W.R., Pretorius J.K., Crandall P.H. and Levesque M.F. 1991. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic *fascia dentata*. *Neuroscience*. 42:351-3673.

Barker JL, Behar T. Li YX, Liu QY., Ma W. Maric D, Maric I, Schaffner AE, Serafini R. Smith SV, Somogyi R. Vautrin J.Y. Wen XL and Xian H. 1998. GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 5: 305-322.

Battaglioli, G. and Martin, D.L.1990. Stimulation of sinaptosomal  $\gamma$ -aminobutiric acid and synthesis by glutamate and glutamine. *J. Neurochem.* 54, 507-524.

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

Bayon A. Possani L.D. and Tapia R. 1977. Kinetics of brain glutamate decarboxylase inhibition studies with N- (5- phosphopyridoxyl) amino acids. *J. Neurochem.* 29:519-525.

Blackstad, T. W. and Kjaerheim, A. 1961. Special axon-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fiber. *J. Comp. Neurol* 117: 113 – 159.

Buckmaster, P. S., Soltesz, I. Neurobiology of the hippocampal interneurons: A workshop review. *Hippocampus* 6:330-339, 1996.

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

Buhl E.H., Otis T.S., and Mody, I. 1996. Zinc-induced collapse of augmented inhibition by GABA in a temporal lobe epilepsy model. *Science.* 271: 369-373.

Cavazos J.E and Sutula T.P. 1990. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res.* 527:1-6.

Cavazos J.E., Golarai G., and Sutula T.P. 1991. Mossy fibers synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J. Neurosci.* 11:2795-2803.

Chapman A.G. and Evans M.C. 1983. Cortical GABA turnover during bicuculline seizures in rats. *J. Neurochem.* 41:886-889.

Chandy, J., Pierce, J. P., Milner, T. A. Rat hippocampal mossy fibers contain cholecystokinin-like immunoreactivity. *Anat. Rec.* 243:519-523, 1995.

Chicurel, M. E. and Harris K. M. 1992. Three dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationship with mossy fiber buttons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 325: 169 – 182.

Claiborne, B. J., Amaral, D. G. and Cowan, W. M. 1986. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 246: 435 – 458.

Crawford, I.L., and Connor, J.D. 1973. Localization and release of glutamic acid in relation to the hippocampal mossy fiber pathway. *Nature* 244: 442-442.

Del Rio JA, Martinez A., Alaudell C. Soriano E. 2000. Developmental history of the subplate and developing white matter in the murine neocortex. Neuronal organization and relationship with the main afferent systems at embryonic and perinatal stages. *Cereb Cortex* 10:784-801.

Ding, R., Asada, H. and Obata, K. 1998 Changes in extracellular glutamate and GABA levels in the hippocampal CA3 and CA1 areas and the induction of glutamic acid decarboxylase-67 in dentate granule cells of rats treated with kainic acid. *Brain Res* 800, 105-113.

Dragunow, M. and Robertson, H.A. 1988. Kindling stimulation induces c-fos protein in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature*. 329: 411-442.

Feldblum S. Erlander M.G. and Tobin A.J. 1993. Different distributions of GAD65 and GAD67 ARNm suggest that the two Glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J. Neurosci. Research.* 34: 689-706.

Fonnum F. 1984. Glutamate. A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42: 1-11.

Frotscher, M. 1985. Mossy fiber form synapses with identified pyramidal basket cells in the CA3 region of the guinea-pig hippocampus: a combined Golgi-electron microscope study. *J. Neurocytol.* 14: 245 – 259.

Frotscher, M. Kraft, J. and Zorn, U. 1988. Fine structure of identified neurons in the primate hippocampus. A combined Golgi/EM study in the baboon. *J. Comp. Neurol* 275:254 – 270.

Frotscher, M., Soriano, E., Misgeld, U. Divergence of hippocampal mossy fibers. *Synapse* 16:148-160, 1994.

Giorgi O. and Meek J.L. 1984.  $\gamma$ -Aminobutyric acid turnover in the rat striatum: effects of glutamate and kainic acid. *J. Neurochem.* 42: 215-220.

Gómez-Lira G, Trillo, E. Ramírez, M. Asai, M. Sitges M. Gutiérrez, R. 2001 Expression of GABAergic transmission in the mossy fiber synapse coincides with the expression of GAD67 in granule cells and GABA in mossy fiber synaptosomes. *Exp. Neurology* 177: 276-283, 2002.

Goddard G.V., McIntyre D.C. and Leech C.K. 1969. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol.* 25:295-330.+

Green J.D. 1964. The hippocampus. *Physiol. Rev.* 44: 561-608.

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

Griffith W.H., Brown T.H. and Johnston D. 1986. Voltage-clamp analysis of synaptic inhibition during long-term potentiation in hippocampus. *J. Neurophysiol.* 55:767-775.

Gutiérrez, R. 2000. Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic neurotransmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J. Neurophysiol.* 84: 3088-3090.

Gutiérrez, R. 2002. Activity-Dependent Expression of Simultaneous Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission From the Mossy Fibers In Vitro. *J Neurophysiol.* 87: 2562-2570

Gutiérrez, R. and Heinemann, U. 2001. Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus - CA3 projection. *Eur. J. Neuroscience* 13: 1371-1379.

Gutiérrez, R., Romo-Parra, H., M.C. Vivar, Maqueda, J., Ramírez, M., Morales M.A., Lamas, M. Plasticity of the GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus. 2003 *J. Neurosci.*23(13):5594-5598

Hawkins, A. y Dodd P. 2000. Localization of GABAA receptor subunits in the CNS using RT- PCR in situ. *Brain Research Protocols*. 6: 47-52.

Heineman U., Beck H., Dreier J.P., Ficker E., Stabel J., and Zhang C.L. 1992 The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. In: *The Dentate Gyrus and Its Role in Seizures*. Edited by Ribak C.E. Gall, C.M. and Mody I. Amsterdam: Elsevier. pp 273-280.

Houser C.R., Harris A.B, and Vaughn J.E. 1986. Time course of the reduction of GABA terminals in a model of focal epilepsy: a glutamic acid decarboxylase immunocytochemical study. *Brain Res*. 238.413-420.

Iadarola M. and Gale K. 1980. Evaluation of increase in nerve terminal-dependent vs. nerve-independent compartments of GABA In vivo *Brain. Res. Bull*. 5: s213-s219.

Isokawa, M., Levesque M.F., Babb T.L. and Engel J. 1993. Single mossy fiber axonal systems of human dentate granule cells studied in hippocampal slices from patients with temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci*. 13: 1511-1522.

Johnston D. and Amaral D. G. 1998. Hippocampus. In: *The synaptic organization of the brain*. G. M. Shepherd (Ed). Oxford University Press. U.S.A.

Johnston D. and Brown T.H. 1981. Giant Synaptic potential hypothesis for epileptiform

activity. *Science*. 211:294-297.

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

Kash S. F., Johnson R.S., Tecott L.H., Noebels J.L., Mayfield D., Hanahan D. and Baekkeskov S. 1997. Epilepsy in mice deficient in the 65kD isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:14060-14065.

Katarova Z., Szabo G., Mugnaini E. and Greenspan R.J. 1990. Molecular identification of the glutamic acid decarboxylase from de mouse. *Eur. J. Neurosci*. 2: 190- 202.

Kaufman D.L., Houser C.R., and Tobin A.J 1991. Two forms of the gamma aminobutiric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneural distributions and cofactor interactions. *J. Neurochem*.56 720-726.

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

Kosaka T. 1983. Axon initial segments of the granule cells in the rat dentate gyrus: Synaptic contacts on bundles of axon initial segments. *Brain Res*. 274:129-134.



Lamas, M. Gómez-Lira, G. y Gutiérrez R. (2001). Vesicular GABA Transporter RNAm Expression in the dentate gyrus and in mossy fiber synaptosomes. *Mol. Brain Res.* 93:209-214.

La salle Le Gal, G., Kajijima, M. And Feldblum, S. 1983. Abortive amygdaloid kindled seizures following microinjection of  $\gamma$ -vinyl-GABA in the vicinity of substantia nigra in rats. *Neurosci. Letters.* 36:69-74.

Lauder J.M. 1993. Neurotransmitters as growth regulatory signals the role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci* 16:233-240.

Laurie DJ, Wisden W. Seeburg PH. 1992. The distribution of thirteen GABAA receptor subunit RNAs in the rat brain. III Embryonic and postnatal development . *J. Neurosci.* 12:41511-41172.

Lehmann, H., Ebert, U. and Löscher, W. 1996 Immunocytochemical localization of GABA immuno- reactivity in dentate granule cells of normal and kindled rats. *Neurosci. Lett.* 212 41-44.

Lloyd, K.G. 1986. La theorie GABAergique de l'épilepsie. *Therap. Neurol.* 36:243-254.

Lipton S.A., Kater S.B. 1989 Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends. Neurosci* 12: 265-270.

Lorente de Nó R. 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* 46:113-177.

Loscher W., Honack D. and Taylor C.P. 1991. Gabapentin increases aminooxyacetic acid-induced GABA accumulation in several regions of the rat brain. *Neurosci. Lett.* 128: 150-154.

Markstainer, J., Ortker, M., Bellmann, R., Sperk, G. Neuropeptide Y biosynthesis is markedly induced in mossy fibers during temporal lobe epilepsy of the rat. *Neurosci. Lett.* 112:143-148, 1990.

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

Ma W. and Barker JL. 1995. Complementary expression of transcripts encoding GAD67 and GABA A receptor  $\alpha 4, \beta 1$  and  $\gamma 1$  subunits in the proliferative zone of the embryonic rat central nervous system. *J. Neurosci* 15: 2547-2560.

Maru E. and Goddard G. V. 1987. Alteration in the dentate neuronal activities associated with perforant path kindling III. *Exp. Neurol.* 96:46-60.

McLaughlin B., Wood J. Saito K., Barber R., Vaughn J., Roberts E. and Wu J.Y. 1974. The fine localization of glutamate decarboxylase in the rat cerebellum. *Brain Res.* 76:377-391.

McIntire S.L., Reimer, J.R. Schuske K., Edwards R.H and Jorgensen, E.M. 1997. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature.* 389:870-876.

Meier E., Jorgensen OS and Schousboe A. 1987. Effect of repeated treatment with  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptor agonist on postnatal neural development in rats. *J. Neurochem* 49: 1462-1470.

Meldrum B. 1984. Amino acid neurotransmitters and new approaches to anticonvulsant drug action. *Epilepsia* 25 (Suppl 2). S140-S149.

Miles R. and Wong R.K.S. 1987 Inhibitory control of local excitatory circuits in the guinea pig hippocampus. *J. Physiol. London* 463: 461-473.

Mody, I. and Heinemann, U. 1987. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling. *Nature* 326, 701-704.

Mugnaini, E. and Oertel, W. H. 1985. An Atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry . In *Handbook of*

Chemical Neuroanatomy, Vol. 4. GABA and Neuropeptides in the CNS. Part 1. (A Björklund and T. Hökfelt. Eds). Elsevier Amsterdam. pp 436-608.

Muro-Cacho C.A. 1997. In situ PCR Overview of procedures and applications. *Frontiers in Bioscience*. 2 :15-29.

Nuovo, J. G. 1997. PCR in situ Hybridisation, Protocols and Applications. Lippincott-Raven. Philadelphia, PA, USA.

O'Keefe, J., Nadel, L. 1978. The hippocampus as a cognitive map. Oxford. Clarendon.

Olbrich H.G. and Braak H. 1985. Ratio of pyramidal cells *versus* non pyramidal cells in sector CA1 of the human Ammon's horn. *Anat. Embryol.* 173:105-110.

Paulsen R.E., Odden E. and Fonnum, F. 1988. Importance of glutamine for  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis and metabolism illustrated by effect of the  $\gamma$ -vinil GABA and hipoglycemia. *J. Neurochem.* 50:1151-1157.

Qiao X. and Noebels J.L, 1993. Developmental analysis of hippocampal mossy fiber outgrowth in a mutant mouse with inherited spike-wave seizures. *J. Neurosci.* 13:4622-4635.

Racine R. 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 32:281-294. .

Racine R. 1978. Kindling: The first decade. *Neurosurgery*. 3: 234-251

Ramírez, M. y Gutiérrez R. 2001. Activity- dependent expression of the GAD67 in the granule cells of the rat hippocampus. *Brain Res*. 917. 139-146.

Represa, A. and Ben-Ari, Y. 1992. Kindling is associated with the formation of novel mossy fiber synapses en the CA3 region. *Exp. Brain Res*. 92: 69 – 78

Represa A., Jorquera I., Le Gal L.A., Salle G. and Ben Ari Y. 1993. Epilepsy induced collateral sprouting of the hippocampus mossy fibers: does it induce development of ectopic synapses with granule cell dendrites? *Hippocampus*. 3:257-268.

Ramon y Cajal, S. 1911. *El sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. Moya. Madrid.

Reimer J.R., Fon, E. A. and Edwards, R.H. 1998. Vesicular neurotransmitter and the presynaptic regulation of quantal size. *Current opinion in neurobiology*.8: 405-412.

Represa A., Jorquera I., Le Gal L.A., Salle G. and Ben Ari Y. 1993. Epilepsy induced collateral sprouting of the hippocampus mossy fibers: does it induce development of ectopic synapses with granule cell dendrites? *Hippocampus*. 3:257-268.

Ribak C.E. and Seress L. 1983. Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus:

a combined Golgi and electron microscopic study. *J. Neurocytol.* 12:557 -597.

Rimvall K. and Martin D.L. 1992. Increased intracellular  $\gamma$ -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. Martin D.L. 1993. Effects of increased  $\gamma$ -aminobutyric acid levels on GAD67 protein and mRNA levels in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 60. 714-720.

Rorsman P., Berggren P.O., Boksvit K., Ericsson H., Mohler H., Otenson G.C. and Smith P.A. 1989. Glucose inhibition of glucagon secretion involves activation of GABA<sub>A</sub> receptor chloride channel. *Nature* 341.233-236.

Ruano, D. Araujo, F. Revilla, E. Vela, j. Bergis, O. and Vitorica J. 2000. GABA<sub>A</sub> and  $\alpha$ -amino-3hidroxy-5-methylsoxale-4-propionate receptors are differentially affected by aging in the rat. *Hippocampus J. Biol. Chem.* 275. 19585-19593.

Saito K., Barber R., Wu J.Y., Matsuda T., Roberts E. and Vaughn, J.E. 1974. Immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase in rat cerebellum. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 71. 269-273.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Sandler, R. and Smith, A.D. (1991) Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: An ultra structural study. *J. Comp. Neurol.* 303: 177- 192.

Scott, B. W., Wang, S., Burnham, W. M., De Boni, U. and Wojtowicz, J. M. 1998. Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neurosc. Let.* 248: 73 – 76.

Schousboe A.1990. Neurochemical alterations associated with epilepsy or seizure activity. In *comprehensive Epileptology* (Dam M. and Gram L. eds.). Raven Press. New York. 1-16.

Schmidt D. and Loscher W. 1981. GABA concentrations in cerebrospinal fluid and plasma of patients with epileptic seizures. In *neurotransmitters, seizures and epilepsy.*( P.L Morselli W. Loscher, K.G Lloyd, B. Meldrum and Reynolds I. eds). New York: Raven Press, pp 315-324.

Schwarzer, C. and Sperk,G. (1995) Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase-67 after limbic seizures in the rat. *Neuroscience* 69:705-709.

Scoville W.B., Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampus lesions. *J. Neurol. Psychiatry.* 20: 11-21.

Sloviter, R.S., Dichter, M.A., Rachinsky, T.L., Dean, E., Goodman, J.H., Sollas, A.L. and Martin, D.L. (1996) Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA

in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 373: 593-618.

Soghomonian J.J. and Martin D.L. 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *TiPS.* 19: 500-505.

Swanson, D.H., Sawchenko P.E. and Cowan W.M.1980. Evidence that the commissural, associational and septal projections of the region inferior of the hippocampus arise from the same neurons. *Brain. Res.* 197:207-212.

Szábo G., Karartova Z., Kortvely E., Greenspan R.J. and Urban Z. 1996. Structure and the promoter region of the mouse gene encoding the 67kD form of glutamic acid decarboxylase. *DNA Cell Biol.* 15 1081-1091.

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 in CNS. In handbook of psychopharmacology, Vol 4. (Iversen, L.L.; Iversen, S.D. and Snyder S.H. eds.). Plenumm. Press. New York. Pp 1-58.

Taylor J. and Gordon- Weeks PR, 1989. Developmental changes in the calcium dependency of gamma- aminobutyric acid release from growth cones: correlation with growth cone morphology. *J. Neurochem* 54:1689-1699.



Terrian, D. M., Gannon, R. L., Rea, M. A. Glutamate is the endogenous amino acid selectively released by rat hippocampal mossy fiber synaptosomes concomitantly with prodynorphin-derived peptides. *Neurochem. Res.* 15:1-15, 1990.

Walker M.C., Ruiz A. and Kullmann D.M. 2001. Monosynaptic GABAergic signalling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy synapses. *Neuron.*29:703-715.

# Plasticity of the GABAergic Phenotype of the “Glutamatergic” Granule Cells of the Rat Dentate Gyrus

Rafael Gutiérrez,<sup>1</sup> Héctor Romo-Parra,<sup>1</sup> Jasmín Maqueda,<sup>1</sup> Carmen Vivar,<sup>1</sup> Mónica Ramírez,<sup>1</sup> Miguel A. Morales,<sup>2</sup> and Mónica Lamas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 14-740, México 07000, and <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, México 04510

The “glutamatergic” granule cells of the dentate gyrus transiently express a GABAergic phenotype when a state of hyperexcitability is induced in the adult rat. Consequently, granule cell (GC) activation provokes monosynaptic GABAergic responses in their targets of area CA3. Because GABA exerts a trophic action on neonatal CA3 and mossy fibers (MF) constitute its main input, we hypothesized that the GABAergic phenotype of the MF could also be transiently expressed early in life. We addressed this possibility with a multidisciplinary approach. Electrophysiological recordings in developing rats revealed that, until day 22–23 of age, glutamate receptor antagonists block the excitatory response evoked in pyramidal cells by GCs, isolating a fast metabotropic glutamate receptor-sensitive GABAergic response. In a clear-cut manner from day 23–24 of age, GC activation in the presence of glutamatergic antagonists was unable to evoke synaptic responses in CA3. Immunohistological experiments showed the presence of GABA and GAD<sub>67</sub> (glutamate decarboxylase 67 kDa isoform) in the developing GCs and their MF, and, using reverse transcription-PCR, we confirmed the expression of vesicular GABA transporter mRNA in the developing dentate gyrus and its downregulation in the adult. The GABAergic markers were upregulated and MF inhibitory transmission reappeared when hyperexcitability was induced in adult rats. Our data evidence for the first time a developmental and activity-dependent regulation of the complex phenotype of the GC. At early ages, the GABAergic input from the MF may add to the interneuronal input to CA3 to foster development, and, in the adult, it can possibly protect the system from enhanced excitability.

**Key words:** granule cells; mossy fibers; GABA; glutamate; development; plasticity; dentate gyrus; CA3

## Introduction

During the first postnatal week, GABA exerts a depolarizing effect on CA3 hippocampal neurons, enabling NMDA receptors to activate (Leinekugel et al., 1997). From the second week, GABA exerts an inhibitory action (Gaiarsa et al., 1995; Ganguly et al., 2001), after which pyramidal cells reach adult features (Bayer, 1980). Thus, it has been proposed that the GABAergic input onto CA3 cells, thought to be originated in hilar and CA3 interneurons, exerts a trophic effect during development (Ben-Ari et al., 1994, 1997).

In the adult rat, the “normally glutamatergic” granule cells (GCs) of the dentate gyrus (DG) transiently express a GABAergic phenotype in an activity- and protein synthesis-dependent manner (Schwarzer and Sperk, 1995; Lehmann and Löscher, 1996; Sloviter et al., 1996; Lamas et al., 2001; Ramírez and Gutiérrez, 2001; Gómez-Lira et al., 2002; Gutiérrez, 2002), giving rise to GABAergic transmission from the mossy fibers (MFs) onto their

targets in CA3 (Gutiérrez, 2000, 2002; Gutiérrez and Heinemann, 2001; Romo-Parra et al., 2003).

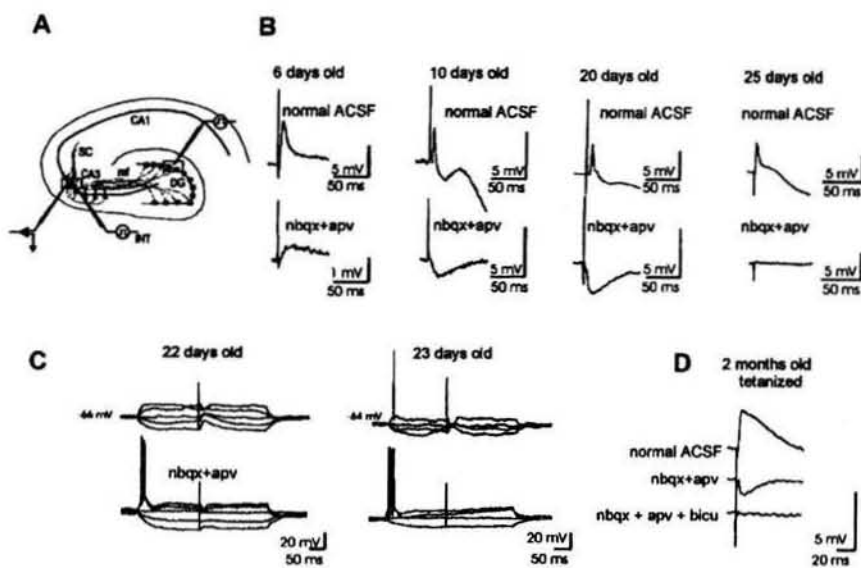
If as suggested, MFs release GABA besides glutamate, pyramidal cells could be driven by the MF-GABAergic signaling as well during development and could constitute an effective means to support the glutamate–GABA synergism on developing postsynaptic cells (Leinekugel et al., 1997). Therefore, we hypothesized that GCs could normally express their GABAergic phenotype during development, when GABA is needed to exert a trophic input to pyramidal cells adding to the GABAergic input of the hilar and CA3 interneurons. After completion of development, the expression of the GABAergic phenotype could be downregulated to establish the adult interneuron-mediated disinhibitory inhibition onto CA3 targets. It is noteworthy that this possibility can also explain data showing that MF-GABAergic transmission is normally present in slices of young guinea pigs (Walker et al., 2001). We addressed this possibility and found that GABAergic markers are expressed in the GCs early in life, and MF-GABAergic transmission is normally observed in rats until day 22–23 of age. Strikingly, from this day on, activation of the GCs in the presence of glutamatergic antagonists no longer evokes synaptic responses in pyramidal cells while the GABAergic markers are downregulated. The induction of hyperexcitability reestablishes MF-GABAergic transmission and GABAergic markers expression.

Received Dec. 10, 2002; revised April 7, 2003; accepted May 7, 2003.

This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 36178-N and by the Third World Academy of Sciences Grant 01-401 (R.G.). M.L. was supported by the G-Fund.

Correspondence should be addressed to Rafael Gutiérrez, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 14-740, México 07000. E-mail: grafael@fisio.cinvestav.mx.

Copyright © 2003 Society for Neuroscience 0270-6474/03/235594-05\$15.00/0



**Figure 1.** *A*, Sites of stimulation in the DG and recording in CA3c. *B*, Synaptic responses of pyramidal cells to DG activation at different ages before (normal ACSF) and after perfusion of NBQX plus APV show that MF-GABAergic transmission is transiently expressed during development. *C*, Synaptic responses evoked at different membrane potentials before and after NBQX plus APV show MF-GABAergic signaling at day 22 and its downregulation at day 23 of age. After this age, MF-GABAergic transmission is induced in an activity-dependent manner (*D*). Traces in *B* and *D* are an average of 10 responses.

## Materials and Methods

We used Wistar rats of 6, 10, 15, 20, 22, 23, and 25 d and 1 and 2 months of age. Combined entorhinal cortex–hippocampus slices (400  $\mu$ m) were obtained and maintained at room temperature (22°C) in oxygenated artificial CSF (ACSF) containing the following (mM): 124 NaCl, 3 KCl, 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{MgSO}_4$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , and 10 glucose, pH 7.35.

**Electrophysiological experiments.** After incubating the slices with ACSF at  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$  for 1 hr in an air–liquid interface recording chamber, we recorded intracellular activity of pyramidal cells over area CA3a with glass microelectrodes (resistance, 60–80 M $\Omega$ ; filled with 2 M potassium acetate) (Fig. 1*A*). An AxoClamp 2B amplifier and pClamp8 software (Axon Instruments, Foster City, CA) were used for acquisition and analysis. For GC activation, single-pulse stimulation (duration of 0.1 msec) was delivered with a patch pipette (1 M $\Omega$ , filled with ACSF) over the GC layer of the DG (Fig. 1*A*), at an intensity that evoked an EPSP with 60–70% of the amplitude required to make the cell fire action potentials. For interneuron activation, a patch pipette was placed 200–300  $\mu$ m away from the recording electrode over the limit of the strata pyramidale and lucidum. To induce MF-GABAergic transmission in adult preparations, three 1 sec trains of 0.1 msec pulses at 100 Hz (intertrain interval of 1 min) were delivered every 15 min for 3 hr over the perforant path at an intensity at which test pulses provoked 50% of maximal field potential amplitude in the DG (Gutiérrez, 2002).

The drugs used were diluted in the ACSF: the NMDA receptor antagonist (DL)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) (30  $\mu$ M; Tocris Cookson, Ballwin, MO); the non-NMDA receptor antagonist 6-nitro-7-sulfamoylbenzo (f)quinoloxaline-2,3-dione (NBQX) (10  $\mu$ M; Tocris Cookson); the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline methiodide (20  $\mu$ M) (Sigma, St. Louis, MO); and the group III metabotropic glutamate receptor (mGluR) agonist L(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP-4) (10  $\mu$ M; Tocris Cookson).

**Immunohistological experiments.** GAD<sub>67</sub> (glutamate decarboxylase 67 kDa isoform) and GABA immunoreactivity (IR) was analyzed in hippocampal slices of four animals of each age group as mentioned above plus a group of 24 d, as described previously (Ramírez and Gutiérrez, 2001). Briefly, slices were fixed in paraformaldehyde at 4% in PBS, cryoprotected in 30% sucrose, and then frozen and cut at 14 or 30  $\mu$ m in a cryostat at  $-20^\circ\text{C}$ . They were incubated in the presence of rabbit GAD<sub>67</sub> antibody (1:1000; Chemicon, Temecula, CA) and then in the presence of

goat anti-rabbit IgG coupled to FITC (Vector FI-1000, 1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Detection of GABA-IR was done with a rabbit polyclonal antibody (Sigma; A2052; 1:1000 dilution) and a donkey biotinylated anti-rabbit IgG (RPN 1004; 1:300 dilution) and further incubated with FITC-streptavidin (Zymed 43-4311; 1:200 dilution; Zymed, San Francisco, CA). Selected sections were analyzed (usually 14 optical sections of 1  $\mu$ m) with a scanning confocal microscope (MRC 1024; Bio-Rad, Hercules, CA). Images were acquired with an excitation wavelength of 488 nm (Confocal Assistant; Tood Clark Brelje), and a densitometric analysis was conducted (Metamorph Imaging System; Universal Imaging Corporation, West Chester, PA) over two sites (CA3a and CA3b) of the stratum lucidum in four slices of each of three animals at 15, 22, 23, 24, and 30 d of age at high magnification (60 $\times$ ). Immunofluorescence, expressed in arbitrary units of pixel gray values, was averaged per age group and scaled for graphical representation with a minimal and maximal relative value at 30 and 15 d of age, respectively. For control purposes, each experiment included a slice processed in the absence of the primary antibody.

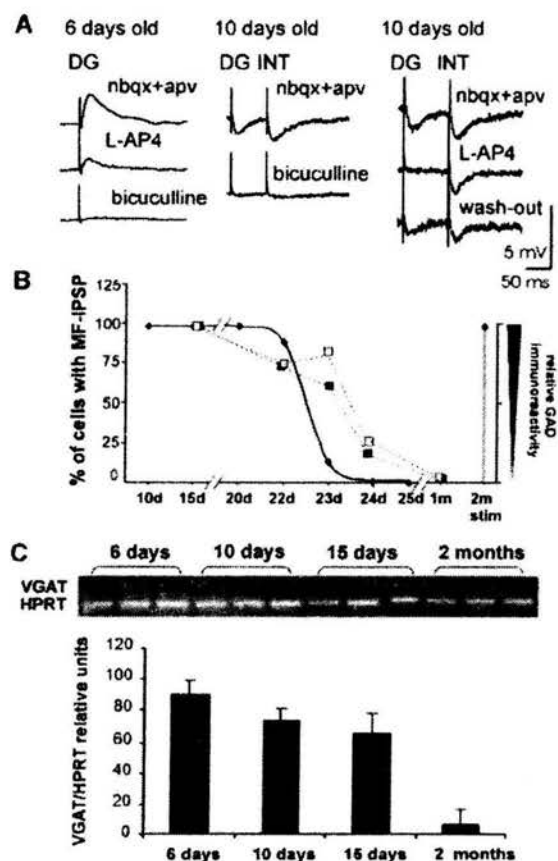
### Vesicular GABA transporter mRNA analysis.

The semiquantitative determination of vesicular GABA transporter (VGAT) mRNA has been described previously (Lamas et al., 2001). In brief, it was analyzed by PCR coamplification with the endogenous internal standard gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) from the granular cell layer of the DG dissected from two 500- $\mu$ m-thick hippocampal slices from each of three rats at 6, 10, and 15 d and 2 months of age. The primer set for VGAT was designed to amplify bases 471–1120 of the rat coding sequence (McIntire et al., 1997). VGAT oligonucleotide primers were designed so as to bind to different exons allowing amplification products derived from cDNA and completely avoiding contaminating genomic DNA. The primer set that targets the constitutively expressed gene *HPRT* amplifies a 370 bp PCR fragment. Samples of the different age groups were processed simultaneously and blindly analyzed by triplicate. The number of PCR cycles was fixed to yield a constant *HPRT* signal in all groups for each experiment. After PCR, the DNA products were electrophoresed on 1.2% agarose gels and stained with ethidium bromide. They were placed on a UV transilluminator and photographed with Polaroid-type 667 instant film. Photographs were subjected to densitometric analysis using LabWorks 4.0 software (UVP, Upland, CA).

## Results

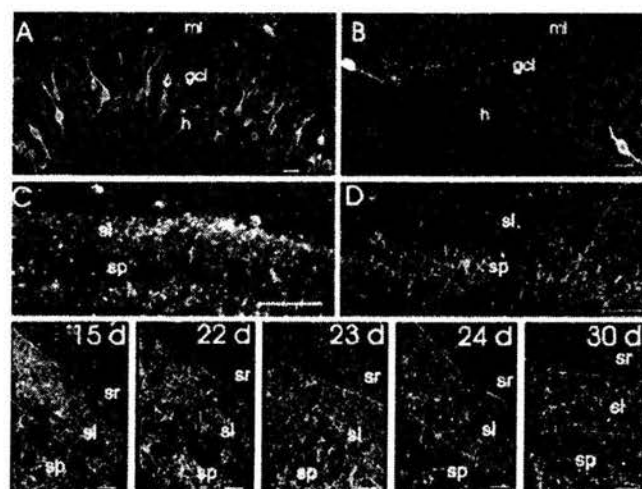
### Electrophysiological experiments

In 6-d-old preparations, pyramidal cells responded to DG activation with a monophasic depolarizing potential, which was partially blocked by NBQX plus APV ( $n = 9$ ) (Fig. 1*B*). The remaining depolarizing component could be blocked by bicuculline ( $n = 6$ ) (Fig. 2*A*). From day 10 of age on, DG stimulation provoked depolarizing and hyperpolarizing postsynaptic potential sequences (EPSP/IPSP) (Fig. 1*B*). On perfusion of NBQX plus APV, the EPSP was completely blocked and a fast bicuculline-sensitive IPSP was uncovered in all of the recorded cells from slices of 10-, 15-, and 20-d-old rats ( $n = 90$ ) (Figs. 1*B*, 2*A*). The same responses were obtained in two electrophysiologically identified interneurons in a 10-d-old preparation (data not shown). The latencies of the pharmacologically isolated IPSPs for each age were not different from those of the corresponding control EPSPs. Thus, the mean latency difference of the EPSP and



**Figure 2.** *A*, DG stimulation evokes bicuculline-sensitive monosynaptic depolarizing potentials at 6 d and hyperpolarizing responses at 10 d of age in pyramidal cells in the presence of NBQX plus APV. Contrary to responses of interneuronal (INT) origin, these responses are reversibly inhibited by L-AP-4. Traces are an average of 10 responses. *B*, Percentage of pyramidal cells that responded with a fast IPSP to DG activation in the presence of NBQX plus APV at different ages (rhombuses). In adults, MF-GABAergic transmission can be induced in an activity-dependent manner (stim).  $GAD_{67}$  immunoreactivity determined by densitometric analysis in CA3a (open squares) and in CA3b (filled squares) follows a similar trend. *C*, Expression of VGAT gene transcripts in the isolated DGs at the depicted ages. The bar graph shows the VGAT/HPRT ratio obtained from the whole series of experiments ( $n = 3$  by triplicate), evidencing the expression of VGAT mRNA when MF-GABAergic transmission can be detected and its age-dependent downregulation.

GABAergic potential ( $0.13 \pm 0.08$  msec) was consistent with a monosynaptic contact, as determined by a one-way ANOVA test and Scheffé post-ANOVA contrast (6 d,  $F = 1.1$ ; 10 d,  $F = 1.0$ ; 15 d,  $F = 1.04$ ; 20 d,  $F = 1.4$ ; 22 d,  $F = 1.4$ ;  $p < 0.05$ ). The reversal potential of the bicuculline-sensitive depolarizing potential determined at 6 d was  $-46.5 \pm 5.1$  (mean resting membrane potential,  $-69.6 \pm 1.8$  mV;  $n = 9$ ) and of the IPSPs in 10-, 15-, 20-, and 22-d-old rats was  $-68 \pm 1.6$  mV (mean resting membrane potential,  $-64.5 \pm 1.2$  mV;  $n = 116$ ) (Fig. 1C). The rise time (10–90%) of the control EPSP for each age was as follows (in msec): 6 d,  $9.11 \pm 0.6$ ; 10 d,  $6.8 \pm 0.6$ ; 15 d,  $5.6 \pm 0.6$ ; 20 d,  $3.7 \pm 0.4$ ; 22 d,  $3.2 \pm 0.5$ ; 23 d,  $2.8 \pm 0.6$ . The rise time of the isolated MF-evoked IPSP was as follows (in msec): 6 d,  $10.4 \pm 1.3$ ; 10 d,  $8.8 \pm 0.5$ ; 15 d,  $8.6 \pm 0.6$ ; 20 d,  $7.8 \pm 0.3$ ; 22 d,  $7.3 \pm 0.1$ . The group III mGluR agonist L-AP-4, which selectively inhibits MF-GABAergic transmission, reversibly depressed the DG-evoked depolarizing potential (6-d-old rats) and the IPSP (10- to 22-d-old rats) by  $83 \pm 4\%$ , whereas the IPSP evoked in the same cells by direct stimulation of interneurons within CA3 was unaffected ( $n = 47$ ) (Fig. 2A).



**Figure 3.** *A*, Confocal images show the presence of GABA-immunoreactive interneurons and cells with characteristics of GCs within the stratum granulosum (sg) of a 15-d-old preparation, whereas in adult preparations (*B*), only interneurons are visible in the molecular layer (ml) and in the border of the stratum granulosum and hilus (*h*).  $GAD_{67}$ -IR in the stratum lucidum (sl) of a 15-d-old (*C*) and a 2-month-old (*D*) preparation. The series of images below depicts  $GAD_{67}$ -IR in CA3b at the indicated ages. These preparations were simultaneously processed. A clear downregulation is apparent toward the third week of life, when  $GAD_{67}$ -IR is restricted to terminals around pyramidal cells (sp) and to a few in the stratum lucidum and stratum radiatum (sr). Scale bars: *A, B*, lower array, 25  $\mu$ m; *C, D*, 50  $\mu$ m.

After 25 d of age, synaptic responses provoked by DG stimulation were completely blocked by NBQX plus APV ( $n = 150$ ) (Fig. 1B,C). To determine the time at which the monosynaptic MF-GABAergic responses disappear, we recorded from 22- and 23-d-old rats. At age 22 d, 26 of 29 cells, and at age 23 d, 4 of 30 cells responded with a monosynaptic IPSP to MF activation during glutamatergic blockade, indicating that this response shuts off in a clear-cut manner (Figs. 1C, 2B). Because MF-GABAergic transmission can be induced in an activity-dependent manner in adult rats (Gutiérrez, 2002), we recorded from pyramidal cells of slices subjected to the induction protocol (see Materials and Methods) and corroborated that NBQX plus APV blocked the EPSP evoked by GC activation, isolating monosynaptic GABAergic responses in 30 of 30 cells tested (Fig. 1D).

#### VGAT mRNA expression

Because the activity-dependent expression of MF-GABAergic transmission correlated with that of VGAT mRNA in adult rats (Lamas et al., 2001), we explored its level of expression in the DG of developing rats. We found that, at the ages when MF-GABAergic transmission is detected (6, 10, and 15 d), a steady expression of the VGAT mRNA was observed in all of the rats of each age group. In contrast, in the DG of young adult rats (2 months old), in which GABAergic transmission is not observed, VGAT mRNA is barely detected (Fig. 2C).

#### Immunohistological experiments

In slices of 6-, 10-, 15-, and 20-d-old rats, GABA-immunoreactive cells with characteristics of GCs were detected within the stratum granulosum of the DG (Fig. 3A). They had a round cell body, with a defined big nucleus and dendritic projections toward the stratum moleculare of the DG and the putative axonal projection toward the hilus. Although GABA-immunoreactive cells were detected along the whole extension of the stratum granulare, not all cells were GABA immunoreactive.

Also, basket cells in the inner layer of the DG and interneurons in the hilar or molecular regions were apparent, which clearly differed in shape and orientation. In young adult rats, GABA-immunoreactive GCs were seldom detected, but interneurons in the hilus and stratum moleculare could be clearly observed (Fig. 3B). On the other hand, a clear GAD<sub>67</sub>-IR was observed in the MF of developing rats that progressively diminished with age (Figs. 2B, 3). From approximately day 24–25, GAD<sub>67</sub>-immunoreactive terminals were observed around pyramidal cells of CA3, but staining of the stratum lucidum was barely seen (Fig. 3D). The control slices that were processed in the absence of the primary antibody did not present immunoreactivity (data not shown).

## Discussion

We show that the “normally glutamatergic” GCs transiently express a functional GABAergic phenotype during development and after the establishment of hyperexcitability in the adult. A low expression of GAD<sub>67</sub>, GABA, and VGAT mRNA is normally found in GCs and their terminals (Sandler and Smith, 1991; Sloviter et al., 1996; Lamas et al., 2001), and seizures (Schwarzer and Sperk., 1995; Lehmann et al., 1996; Sloviter et al., 1996; Lamas et al., 2001; Gómez-Lira et al., 2002) or LTP-like stimulation (Lamas et al., 2001; Ramírez and Gutiérrez, 2001) upregulate their expression. Accordingly, activity- and protein synthesis-dependent induction of monosynaptic MF-GABAergic signaling onto CA3 is observed (Gutiérrez, 2000, 2002; Gutiérrez and Heinemann, 2001; Gutiérrez, 2002; Romo-Parra et al., 2003). Also, in agreement with the idea that GCs release GABA, Walker et al. (2001) showed monosynaptic MF-GABAergic transmission to be normally present in slices from young guinea pigs. These results, however, were in conflict with our previous results in that no activity-dependent mechanisms seem to be involved in MF-GABAergic transmission. With our present evidence, we show that the developmental stage is the determining factor underlying these apparent conflicting results and establish that developmental and activity-dependent mechanisms underlie this phenomenon.

Our electrophysiological evidence demonstrates that fast mGluR-sensitive GABAergic transmission can be evoked in CA3 by MF activation at early ages. On day 6 of age, MF activation evokes an NBQX plus APV-insensitive depolarizing response that can be blocked by bicuculline and whose reversal potential coincides with GABAergic responses at this age (Ganguly et al., 2001). Thereafter, MF activation provokes hyperpolarizing GABAergic responses that disappear in a clear-cut manner on day 23–24 of age. Both the early depolarizing and hyperpolarizing MF-GABAergic potentials are strongly inhibited by the type III mGluR agonist t-AP-4, which presynaptically inhibits MF-GABAergic transmission (Gutiérrez, 2000, 2002; Walker et al., 2001; Romo-Parra et al., 2003). This is a reliable test to identify neurotransmission of MF origin because these receptors are located in MF terminals (Ohishi et al., 1995). On the other hand, GABAergic responses of interneuronal origin are not affected by mGluR activation (Walker et al., 2001; Romo-Parra et al., 2003). Additional investigation is needed to establish whether glutamate and GABA are released from the same MF terminal and how the proportion of release of both amino acids varies during development.

The release of GABA from MF in the developing rat has possibly been observed (Ben-Ari et al., 1989) but not identified as such. In developing rats, giant synchronous discharges appear that are primarily mediated by GABA<sub>A</sub> receptors and by MF synaptic input. Interestingly, the selective lesion of the DG blocks

most of the excitatory drive to these cells (Henze et al., 1997), suggesting that MF-GABAergic input can be disrupted. Activation of GABA and glutamate receptors happens in synergy in developing rats, because a strong excitatory drive is needed to activate NMDA receptors (Leinekugel et al., 1997). Therefore, it is tempting to speculate that MF-GABAergic transmission possibly contributes to the development of CA3 neurons. Interestingly, the clear-cut shut off of MF-GABAergic responses happens on day 22–23, 2 weeks after GABA has ceased to exert depolarizing actions. This suggests that MF-GABAergic transmission accompanies the morphological maturation of pyramidal cells possibly until the completion of the development of dendrites and spines, which happens at approximately the same time (Ben-Ari, 2001).

In direct correspondence, VGAT mRNA is expressed in the DG of young animals but barely detected when MF-GABAergic transmission is no longer observed. However, MF-GABAergic transmission reappears when hyperexcitability is induced and VGAT mRNA expression is, therefore, upregulated (Lamas et al., 2001). Also, contrary to adult preparations, GABA-immunoreactive putative GCs are detected in the DG, and GAD<sub>67</sub> is clearly observed in the MF of young animals. In our analysis, although some GABA-immunoreactive cells are likely to be basket cells (Ribak and Seress, 1983, 1988), some cells with typical features of GCs are GABA immunoreactive. Granule cells originated at different postnatal ages coexist (Gaarskjaer, 1985), and it seems probable that the younger GCs in the adult, which lie in the inner portion of the GC layer in the developing rat (Altman and Bayer, 1990), are those that express GABAergic markers. It is suggestive that MF innervation of CA3 neurons seems to be more abundant during development and MF extensions are longer by day 14 than in the mature animal (Amaral and Dent, 1981). This could explain why not all GCs need to express GABA. More indicative for the GABAergic phenotype of the MF pathway was its clear GAD<sub>67</sub>-IR observed in the young animals and its downregulation at approximately the same time when DG-to-CA3 disynaptic inhibition is established. Dupuy and Houser (1996) have shown a shift in the intracellular distribution of GAD<sub>67</sub> from cell bodies to terminal-like structures at late prenatal to early postnatal ages and have suggested that the GAD<sub>67</sub>-containing terminal-like structures identified early in life, adjacent to the pyramidal layer in CA3, are likely to be the source of GABA for developmental functions. Finally, for MF-GABAergic transmission to occur, GABA<sub>A</sub> receptors must be in the subsynaptic site. Interestingly, in cultured pyramidal cells, GABA<sub>A</sub> receptors cluster apposed to glutamatergic presynaptic elements, suggesting the hypothesis that there is an element common to GABA and glutamate synapses (Rao et al., 2000). It is therefore likely that pyramidal cells do normally have GABA receptors in apposition to MF inputs, which explains why fast MF-GABAergic synaptic responses can be normally seen in the developing rat and induced in the adult.

The developmental plasticity of MF-GABAergic transmission that we have evidenced reflects the suggested transient expression of the GABAergic phenotype of cells within the DG at early ages (Dupuy and Houser, 1996, 1997). This, together with data showing a sequential formation of functional GABA<sub>A</sub> and glutamatergic synapses (Hennou et al., 2002), put our data in a developmentally relevant perspective. We propose that the complex expression of GC phenotype contributes to developmental and protective functions. This idea has received increasing support and proves that the phenotypic plasticity is put in play in response to environmental influences (Cao et al., 1996). The enhanced excitability of a GABA-releasing MF pathway goes in line with the

protection of principal cells in the hippocampus (Holmes et al., 1999; Haas et al., 2001) and hilar neurons of young animals (Ribak and Navetta, 1994), which in general are less prone to the deleterious effects of seizures.

## References

- Altman J, Bayer SA (1990) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol* 301:365–381.
- Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus. I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195:51–86.
- Bayer SA (1980) Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol* 190:115–134.
- Ben-Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24:353–360.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol (Lond)* 416:303–325.
- Ben-Ari Y, Tseeb V, Ragozzino D, Khazipov R, Gaiarsa JL (1994) gamma-Aminobutyric acid (GABA): a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. *Prog Brain Res* 102:261–273.
- Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL (1997) GABA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated “ménage à trois.” *Trends Neurosci* 20:523–529.
- Cao Y, Wilcox KS, Martin CE, Tachinsky TL, Eberwine J, Dichter MA (1996) Presence of mRNA for glutamic acid decarboxylase in both excitatory and inhibitory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9844–9849.
- Dupuy ST, Houser CR (1996) Prominent expression of two forms of glutamate decarboxylase in the embryonic and early postnatal rat hippocampal formation. *J Neurosci* 16:6919–6932.
- Dupuy ST, Houser CR (1997) Developmental changes in GABA neurons of the rat dentate gyrus: an in situ hybridization and birthdating study. *J Comp Neurol* 389:402–418.
- Gaarskjaer FB (1985) The development of the dentate area and the hippocampal mossy fiber projection of the rat. *J Comp Neurol* 241:154–170.
- Gaiarsa JL, McLean H, Congar P, Leinekugel X, Khazipov R, Tseeb V, Ben-Ari Y (1995) Postnatal maturation of gamma-aminobutyric acid-A and B-mediated inhibition in the CA3 hippocampal region of the rat. *J Neurobiol* 26:339–349.
- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105:521–532.
- Gómez-Lira G, Trillo E, Ramírez M, Asai M, Sitges M, Gutiérrez R (2002) Expression of GABAergic transmission in the mossy fiber synapse coincides with the seizure-induced expression of GABA in mossy fiber synaptosomes. *Exp Neurol* 177:276–283.
- Gutiérrez R (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic neurotransmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol* 84:3088–3090.
- Gutiérrez R (2002) Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers in vitro. *J Neurophysiol* 87:2562–2570.
- Gutiérrez R, Heinemann U (2001) Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus—CA3 projection. *Eur J Neurosci* 13:1371–1379.
- Haas KZ, Sperber EF, Opanashuk LA, Stanton PK, Moshe SL (2001) Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. *Hippocampus* 11:615–625.
- Henou S, Khalilov I, Diabira D, Ben-Ari Y, Gozlan H (2002) Early sequential formation of functional GABA and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. *Eur J Neurosci* 6:197–208.
- Henze DA, Card JP, Barrionuevo G, Ben-Ari Y (1997) Large amplitude miniature excitatory postsynaptic currents in hippocampal CA3 pyramidal neurons are of mossy fiber origin. *J Neurophysiol* 77:1075–1086.
- Holmes GL, Sarkisian M, Ben-Ari Y, Chevassus-Au-Louis N (1999) Mossy fiber sprouting after recurrent seizures during early development in rats. *J Comp Neurol* 404:537–553.
- Lamas M, Gómez-Lira G, Gutiérrez R (2001) Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in mossy fiber synaptosomes. *Mol Brain Res* 93:209–214.
- Lehmann H, Ebert U, Löscher W (1996) Immunocytochemical localization of GABA immunoreactivity in dentate granule cells of normal and kindled rats. *Neurosci Lett* 212:41–44.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1997) Ca<sup>2+</sup> oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18:243–255.
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389:870–876.
- Ohishi H, Akazawa C, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1995) Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain. *J Comp Neurol* 360:555–570.
- Ramirez M, Gutiérrez R (2001) Activity-dependent expression of GAD67 in the granule cells of the rat hippocampus. *Brain Res* 917:139–146.
- Rao A, Cha EM, Craig AM (2000) Mismatched appositions of presynaptic and postsynaptic components in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:8344–8353.
- Ribak CE, Navetta MS (1994) An immature mossy fiber innervation of hilar neurons may explain their resistance to kainite-induced cell death in 15-day-old rats. *Dev Brain Res* 79:47–62.
- Ribak CE, Seress L (1983) Five types of basket cells in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Neurocytol* 12:577–597.
- Ribak CE, Seress L (1988) The development of GABAergic neurons in the rat hippocampal formation. An immunocytochemical study. *Dev Brain Res* 44:197–209.
- Romo-Parra H, Vivar C, Maqueda J, Morales MA, Gutiérrez R (2003) Activity-dependent induction of multitransmitter signaling onto pyramidal cells and interneurons of hippocampal area CA3. *J Neurophysiol* 89:3155–3167.
- Sandler R, Smith AD (1991) Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. *J Comp Neurol* 303:177–192.
- Schwarzer C, Sperk G (1995) Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase 67 after limbic seizure in the rat. *Neuroscience* 69:705–709.
- Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL, Martin DL (1996) Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol* 373:593–618.
- Walker MC, Ruiz A, Kullmann DM (2001) Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses. *Neuron* 29:703–715.

## Glutamic acid decarboxylase (GAD)<sub>67</sub>, but not GAD<sub>65</sub>, is constitutively expressed during development and transiently overexpressed by activity in the granule cells of the rat

Jasmín Maqueda<sup>1</sup>, Mónica Ramírez<sup>1</sup>, Mónica Lamas<sup>2</sup>, Rafael Gutiérrez\*

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Apartado Postal 14-740, 07000 Mexico City, D.F., Mexico

Received 17 June 2003; received in revised form 18 August 2003; accepted 29 August 2003

### Abstract

$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA)-mediated neurotransmission from the granule cells to CA3 is transiently expressed during the first 3 weeks of age in the rat. In the adult, seizures provoke this inhibitory signaling to reappear. To gain insight into the origin of GABA in these cells, we explored the expression of both isoforms of glutamic acid decarboxylase (GAD, 65 and 67 kDa), during development and after seizures in the adult rat. We found that GAD<sub>67</sub>, but not GAD<sub>65</sub>, is expressed in the mossy fibers of developing rats. In adults, GAD<sub>67</sub> is no longer detectable, unless seizures are induced. By contrast, GAD<sub>65</sub> is neither expressed in granule cells nor in their mossy fibers at any age nor after seizures, despite the presence of GAD<sub>65</sub> mRNA, confirmed by reverse transcription–polymerase chain reaction *in situ*.

© 2003 Published by Elsevier Ireland Ltd.

**Keywords:** Granule cell; Mossy fibers;  $\gamma$ -Aminobutyric acid; Glutamic acid decarboxylase; Development; Seizure

The granule cells of the rat constitutively express a dual glutamatergic/GABAergic phenotype during development [6]. Consequently, monosynaptic GABAergic transmission from the mossy fibers (MF) to CA3 is observed during the blockade of ionotropic glutamate receptors [6,19]. Mossy fiber GABAergic transmission is present during the first 22–23 days of age and it is abruptly down-regulated on days 23–24 of age. The expression of GABAergic markers (glutamate decarboxylase (GAD)<sub>67</sub>,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and vesicular GABA transporter (VGAT) mRNA) in the granule cells and their MF follows the same pattern [6]. In the adult rat, the GABAergic phenotype is not normally detected but it is transiently overexpressed by activity- and protein synthesis-dependent mechanisms, as we have consistently proven [2–5,8,13,14].

Noteworthy is that it has been reported that the 67 kDa, but not the 65 kDa, isoform of the GABA-synthesizing enzyme, GAD, is strongly modulated by activity. It has been

proposed that they have different anatomical distribution and, possibly, cellular function. Indeed, previous work has suggested that GAD<sub>67</sub> synthesizes a metabolic pool of GABA, whereas GAD<sub>65</sub> synthesizes the GABA to be released in the synapse [1,7]. Despite this, the up-regulation of GABA [2] and the appearance of MF, GABAergic transmission in adult rats [3–5] coincides with the up-regulation of the 67 kDa isoform [9,13,17,18].

Our recent observations of the expression of GABAergic markers in the developing granule cells [6] have prompted us to explore the regulation of the expression of GAD<sub>65</sub>, in comparison to GAD<sub>67</sub>, in developing and in adult healthy and kindled epileptic rats. In this work we conducted immunohistological experiments to study the expression of both isoforms of GAD during development, and we carried out reverse transcription coupled to polymerase chain reaction (RT-PCR) *in situ* experiments to determine GAD<sub>65</sub> mRNA regulation by kindling epilepsy.

We used Wistar rats of the following ages: 10, 15, 20, 30 days and 2 months. In four 2-month-old rats bipolar microelectrodes were surgically implanted in the amygdala for electrical kindling stimulation, as previously described [3]. Hippocampal tissue of kindled rats was processed a day after the fifth generalized seizure together with a matching

\* Corresponding author. Tel./fax: +52-55-5061-3368.

E-mail address: grafael@fisio.cinvestav.mx (R. Gutiérrez).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this study.

<sup>2</sup> Present address: Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ciudad Universitaria, 04310 México D.F., Mexico.

control group for comparison purposes. Hippocampal slices of young rats at the different ages were also simultaneously processed. Immunoreactivity was analyzed in hippocampal slices of four animals of each age group, in four control and four kindled adults. Immunohistochemistry for GAD<sub>67</sub> in developing rats was conducted as described [6] using a commercial GAD<sub>67</sub> antibody (Chemicon; 1:1000) and a second IgG coupled to FITC (Vector FI-1000; 1:400). Selected sections were analyzed (usually 14 optical sections of 1  $\mu$ m) with a scanning confocal microscope (MRC 600, Bio-Rad). Images were acquired with an excitation wavelength of 488 nm (Confocal Assistant; Tood Clark Brelje). For control purposes, each experiment included a slice processed in the absence of the primary antibody. In adult rats, immunohistochemistry for both GAD isoforms was conducted as previously described [13]. For GAD<sub>65</sub> experiments, we used the GAD<sub>65</sub> antibody purchased from Boehringer Mannheim (1:100) and a secondary biotinylated IgG (1:1000; Jackson Immunoresearch). The slices were processed with the ABC Kit (Vectastain, Vector Labs), developed with diaminobenzidine (Sigma) and contrasted with nickel sulfate (30%). Microscopical observations and micrographs were done with an Axiovert Zeiss microscope with the appropriate photographic equipment.

RT-PCR in situ was conducted in hippocampal slices of three control and three kindled adult rats. It was carried out following previously described protocols [11,12] using previously reported specific GAD<sub>65</sub> primers [15]. Tissue samples fixed in paraformaldehyde (4%) were permeabilized with Triton X-100 (0.25%) to insure full penetration of reagents into the tissue and thereafter incubated with DNase I (RNase-free 776785, Roche). We carried out the in situ RT-PCR in the presence of dUTP coupled to digoxigenin with the GeneAmp EZ rTth RNA PCR kit (Applied Biosystems) following instructions from the manufacturer. cDNA sequences were amplified for 30 cycles. After amplification, the tissue was rehydrated, permeabilized and incubated with a digoxigenin antibody (Roche, 1:100) coupled to alkaline phosphatase. The development reaction was carried out with NBT and BCIP (Roche). The processed tissue was analyzed with an inverted microscope (Axiovert-100, Zeiss) and photographed with a digital camera (Sony Cyber Shot DSC-S75). Control experiments comprised the full procedure without either oligonucleotides or anti-digoxigenin antibody or DNase.

As expected, in slices of 10-, 15- and 20-day-old rats, we found GAD<sub>67</sub> and GAD<sub>65</sub>-immunoreactive (-IR) interneurons in all the hippocampal regions. We confirmed the expression of GAD<sub>67</sub>-IR in the MF of young rats. In Fig. 1A, we show a representative confocal image of the MF region at 15 days of age, where clear immunoreactivity is observed along the stratum lucidum. In contrast, in rats of 1 and 2 months of age, MF did not present GAD<sub>67</sub>-IR (Fig. 1B). Interestingly, the supposedly responsible enzyme for the synthesis of releasable GABA, GAD<sub>65</sub>, was neither detected in the GABA-releasing MF of developing rats nor in adult

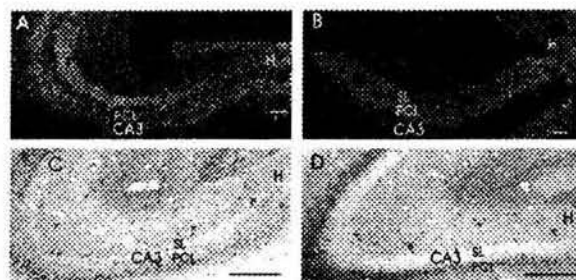


Fig. 1. GAD<sub>67</sub> is expressed in the mossy fiber pathway of developing (A, 15 days old) but not in adult (B) rats. Notice immunoreactivity along the mossy fibers in the stratum lucidum (SL), in A, and its absence in the adult (B). By contrast, GAD<sub>65</sub> immunoreactivity is observed in interneurons (asterisks) but not in the mossy fibers, either in young (C, 15 days old) or in adult rats (D). PCL, pyramidal cell layer; H, hilus. Calibration bars correspond to 100  $\mu$ m in A,B, and 200  $\mu$ m in C,D.

preparations (Fig. 1C,D). We then compared the expression of both isoforms of GAD in control versus kindled epileptic adult rats. We found that GAD<sub>67</sub> is constitutively expressed in basket cells and in some granule cells of non-stimulated rats (Fig. 2A), whereas GAD<sub>65</sub> was only found in basket cells and other interneurons of the hilus and molecular layer (Fig. 2D). In kindled epileptic rats a marked expression of GAD<sub>67</sub> in the granule cells (Fig. 2B) and MF (Fig. 2C) was found besides its overexpression in the interneuronal population. In contrast, GAD<sub>65</sub> was absent in granule cells

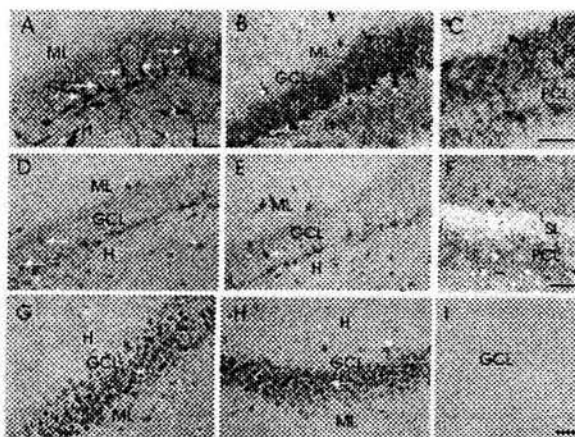


Fig. 2. Kindling epilepsy up-regulates the expression of GAD<sub>67</sub> but not GAD<sub>65</sub>. (A) The granule cell layer and hilar region present some GAD<sub>67</sub>-IR granule cells (arrows) and interneurons (asterisks) in control condition. (B) In kindled rats, GAD<sub>67</sub> is markedly overexpressed in the granule cell layer (GCL) and in the mossy fibers (C), running along the stratum lucidum (SL). (D) By contrast, in control animals GAD<sub>65</sub> is expressed only in interneurons of the molecular (ML) and granule cell layers (GCL) of the dentate gyrus and hilus, although a few cells in the GCL resembling granule cells were GAD<sub>65</sub>-IR (arrows). Kindling epilepsy does not affect the expression of GAD<sub>65</sub> either in the granule cells (E) or in their mossy fibers along the SL (F). RT-PCR in situ experiments show that despite the lack of the protein, GAD<sub>65</sub> mRNA is present in the granule cells of control (G) and kindled rats (H). (I) Control RT-PCR in situ experiment carried out in the absence of the specific oligonucleotides. GAD<sub>65</sub> mRNA was not detected under this condition. H, hilus. All calibration bars correspond to 25  $\mu$ m.



and their MF, although a few cells in the granule cell layer, resembling granule cells, were GAD<sub>65</sub>-IR (Fig. 2E,F). This evidence suggests that GABA released from the granule cells in these animals is synthesized by the 67 kDa isoform. To determine whether the absence of GAD<sub>65</sub> in granule cells was due to the lack of its mRNA, we carried out *in situ* RT-PCR. We found that granule cells of control (Fig. 2G) and epileptic rats (Fig. 2H) express GAD<sub>65</sub> mRNA, without apparent difference in its expression. As expected, slices processed in the absence of the oligonucleotides did not present staining (Fig. 2I).

It is interesting that GAD<sub>65</sub> mRNA is present in the granule cells of adult control rats, in which no MF GABAergic transmission is observed, and GAD<sub>65</sub> protein is absent in developing and epileptic rats, where MF GABAergic transmission is active. We confirmed that GAD<sub>67</sub> is expressed in the MF of developing rats and its expression is down-regulated with age. The induction of seizures and synaptic strengthening up-regulates its expression in the adult dentate gyrus and their MF, which normally contain traces of GABA and transiently express glutamic acid decarboxylase (GAD)<sub>67</sub> and its mRNA [4,9, 13,16–18].

On the contrary, GAD<sub>65</sub>, despite being present during development and up-regulated in interneurons by activity in the adult rat, was not detected either during development or after seizures in the granule cells and their MF. GAD<sub>65</sub> mRNA was present in granule cells of adult rats but, apparently, it was not modified by seizures. However, to be certain that GAD<sub>65</sub> mRNA is or is not modulated by seizures, a quantitative method such as real-time PCR has to be used. Thus, we conclude that despite GAD<sub>65</sub> mRNA being present in the granule cells, it is neither developmentally regulated nor over-expressed by seizures. By contrast, GAD<sub>67</sub> is normally expressed in developing granule cells, down-regulated after the completion of development and thereafter up-regulated in an activity-dependent fashion. The immunohistological evidence gathered so far (present results, [6,13,17,18]), our present *in situ* RT-PCR results and neurochemical data [2,10] establish that GABA released from the MF is synthesized by the 67 kDa isoform of the enzyme.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant 36178-N and by the Third World Academy of Sciences, Grant 01-407 to R.G. The Zeiss microscope used in our study was kindly donated by the Alexander von Humboldt Foundation. We thank Dr M. Morales for his help in establishing the immunofluorescence technique.

#### References

- [1] M.G. Erlander, A.J. Tobin, The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: A review, *Neurochem. Res.* 16 (1991) 215–226.
- [2] G. Gómez-Lira, E. Trillo, M. Ramírez, M. Asai, M. Sitges, R. Gutiérrez, Expression of GABAergic transmission in the mossy fiber synapse coincides with the seizure-induced expression of GABA in mossy fiber synaptosomes, *Exp. Neurol.* 177 (2002) 276–283.
- [3] R. Gutiérrez, Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic neurotransmission in the dentate gyrus-CA3 system, *J. Neurophysiol.* 84 (2000) 3088–3090.
- [4] R. Gutiérrez, Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers *in vitro*, *J. Neurophysiol.* 87 (2002) 2562–2570.
- [5] R. Gutiérrez, U. Heinemann, Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus-CA3 projection, *Eur. J. Neurosci.* 13 (2001) 1371–1379.
- [6] R. Gutiérrez, H. Romo-Parra, J. Maqueda, C. Vivar, M. Ramírez, M.A. Morales, M. Lamas, Plasticity of the GABAergic phenotype of the 'glutamatergic' granule cells of the rat dentate gyrus, *J. Neurosci.* 23 (2003) 5594–5598.
- [7] D.L. Kaufman, C.R. Houser, A.J. Tobin, Two forms of the GABA synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions, *J. Neurochem.* 56 (1991) 720–723.
- [8] M. Lamas, G. Gómez-Lira, R. Gutiérrez, Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in mossy fiber synaptosomes, *Mol. Brain Res.* 93 (2001) 209–214.
- [9] H. Lehmann, U. Ebert, W. Löscher, Immunocytochemical localization of GABA immunoreactivity in dentate granule cells of normal and kindled rats, *Neurosci. Lett.* 212 (1996) 41–44.
- [10] Y. Makiura, F. Suzuki, E. Chevalier, B. Onténiente, Excitatory granule cells of the dentate gyrus exhibit a double inhibitory neurochemical content after intrahippocampal administration of kainate in adult mice, *Exp. Neurol.* 159 (1999) 73–83.
- [11] C.A. MuroCacho, *In situ* PCR overview of procedures and applications, *Front. Biosci.* 2 (1997) 15–29.
- [12] J.G. Nuovo, *PCR In Situ Hybridization, Protocols and Applications*, Lippincott Raven, Philadelphia, PA, 1997.
- [13] M. Ramírez, R. Gutiérrez, Activity-dependent expression of GAD67 in the granule cells of the rat hippocampus, *Brain Res.* 917 (2001) 139–146.
- [14] H. Romo-Parra, C. Vivar, J. Maqueda, M.A. Morales, R. Gutiérrez, Activity-dependent induction of multitransmitter signaling onto pyramidal cells and interneurons of hippocampal area CA3, *J. Neurophysiol.* 89 (2003) 3155–3167.
- [15] D. Ruano, F. Araujo, E. Revilla, J. Vela, O. Bergis, J. Vitorica, GABA<sub>A</sub> and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors are differentially affected by aging in the rat hippocampus, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 19585–19593.
- [16] R. Sandler, A.D. Smith, Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study, *J. Comp. Neurol.* 303 (1991) 177–192.
- [17] C. Schwarzer, G. Sperk, Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase 67 after limbic seizures in the rat, *Neuroscience* 69 (1995) 705–709.
- [18] R.S. Sloviter, M.A. Dichter, T.L. Rachinsky, E. Dean, J.H. Goodman, A.L. Sollas, D.L. Martin, Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus, *J. Comp. Neurol.* 373 (1996) 593–618.
- [19] M.C. Walker, A. Ruiz, D.M. Kullmann, Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses, *Neuron* 29 (2001) 703–715.