



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efectos de la administración aguda y crónica de inhibidores de la glutamato descarboxilasa en la médula espinal de rata.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Diana Elizabeth Colín Martínez

TUTOR PRINCIPAL

Ricardo Tapia Ibarquengoytia

Instituto de fisiología celular, división de neurociencias

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Fatuel Tecuapetla Aguilar

Ignacio Camacho Arroyo

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Ciudad de México. Noviembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Índice

I.- Resumen	2
II.- Lista de abreviaturas	3
III.- Introducción	4
1. Esclerosis lateral amiotrófica	4
2. Neurotransmisión en la médula espinal	5
<i>Células en la médula espinal</i>	5
<i>Neurotransmisión glutamatérgica</i>	6
<i>Excitotoxicidad</i>	7
<i>Neurotransmisión inhibitoria</i>	8
3. Ácido γ -aminobutírico	9
<i>Receptores GABAérgicos</i>	9
<i>Síntesis de GABA</i>	10
<i>Glutamato descarboxilasa</i>	10
<i> Piridoxal-5'-fosfato</i>	11
<i>Inhibidores farmacológicos de la actividad de la GAD</i>	13
4. Alteraciones en las sinapsis excitadoras e inhibitorias y su relación con la degeneración de MNs	14
IV.- Hipótesis	16
V.- Objetivo	16
VI.- Método	16
VII.- Resultados	22
1. Administración aguda de inhibidores de la glutamato descarboxilasa en la médula espinal	22
2. Administración crónica de inhibidores de la glutamato descarboxilasa en la médula espinal durante 3 días	28
3. Administración crónica de inhibidores de la glutamato descarboxilasa en la médula espinal durante 10 días	36
VIII.- Discusión	47
IV.- Conclusión	55
X.- Referencias	55

I.- Resumen

La esclerosis lateral amiotrófica se distingue por la pérdida selectiva de neuronas motoras (MNs)(L Massieu et al., 1994) corticales y espinales. Produce parálisis muscular y muerte entre los 3 a 5 años después del diagnóstico. En pacientes y modelos transgénicos de la enfermedad se han identificado diversas alteraciones en la función de los circuitos GABAérgicos. GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso y su síntesis depende de la actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD). Se han identificado dos isoformas de esta enzima, la GAD65 (apoenzima) y la GAD67 (holoenzima). En este trabajo, administramos directamente en la médula espinal de rata 3 inhibidores de la síntesis de GABA: el ácido 3-mercaptopropiónico (MPA, inhibidor competitivo), la tiosemicarbazida (TSC, bloqueador de la función coenzimática del cofactor) y el fosfato de piridoxal γ -glutamil hidrazona (PLPGH, inhibidor de la piridoxal cinasa). La administración aguda de estas drogas, por separado, no causó ningún efecto sobre la conducta motora o la morfología de las MNs, a las 24 horas después del tratamiento. Por el contrario, la administración crónica de MPA 3, 10, 20 mM, TSC 15 mM o PLPGH 25 mM provocó mioclonías en el miembro ipsilateral dentro de los tres primeros días de tratamiento y flacidez permanente en las falanges de los cuartos traseros. Al tercer y décimo día, la región de la médula espinal en que se infundió cada inhibidor, se procesó para el análisis histológico (grupos independientes). El número de MNs en el lado ipsilateral a la administración disminuyó entre un 35-50%, desde el tercer día de tratamiento, dependiendo del inhibidor. En la inmunohistoquímica, se observó notable gliosis reactiva en el asta ipsilateral, a partir del tercer día. La actividad de la GAD disminuyó en ambas astas ventrales de la médula espinal de ratas tratadas con los inhibidores durante tres días, pero no lo hizo en el tejido de ratas tratadas durante diez días. Estos resultados sugieren que la inhibición crónica de la síntesis de GABA produce un decremento en la función de los circuitos GABAérgicos, suficiente para causar degeneración de MNs, probablemente mediada por excitotoxicidad. Entender el papel del metabolismo del GABA en la médula espinal, podría ayudarnos a dilucidar los mecanismos que producen la pérdida de MNs en la ELA.

II.- Lista de abreviaturas

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
ELA: Esclerosis lateral amiotrófica
ELAF: Esclerosis lateral amiotrófica familiar
ELAS: Esclerosis lateral amiotrófica esporádica
FF: Fibra muscular de rápida contracción y fatigable
FR: Fibra muscular de rápida contracción y resistente a la fatiga
GABA-T: Aminobutirato-2-oxoglutarato aminotransferasa
GABA: Ácido γ -aminobutírico
GAD: Glutamato descarboxilasa
GAH: L-glutámico- γ -hidrazida
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
GLT1: Transportador astrocítico de glutamato
GlyT2: Transportador vesicular de glicina
MNs: Neuronas motoras
MPA: Ácido 3-mercaptopropiónico
NMDA: N-metil-D-aspartato
PB: Buffer de fosfato
PLP: Piridoxal-5'-fosfato
PLPGH: Fosfato de piridoxal- γ -glutamil hidrazona
RTF: Registro de la tensión muscular ejercida por las falanges
S: Fibra muscular de lenta contracción
SMI-32: Neurofilamento pesado no fosforilado
TSC: Tiosemicarbazida

III.- Introducción

1.- Esclerosis lateral amiotrófica

Existen numerosas enfermedades que afectan a la sobrevivencia de las MNs. La ELA se caracteriza por la pérdida selectiva de las MNs corticales y espinales. Puede ser de inicio bulbar o lumbar y provoca debilidad muscular, espasticidad, fasciculaciones, parálisis progresiva y finalmente muerte por falla respiratoria entre los 3 a 5 años después del diagnóstico Tiryaki y Horak (2014). De acuerdo a su origen se han descrito dos tipos: esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELAF) y esporádica (ELAS). Se estima que su incidencia mundial es de 1.5 a 2 personas por cada 100,000 habitantes, de los cuales el 10% son de tipo familiar y el restante 90% de tipo esporádica. La ELAF es ocasionada por mutaciones en diversos genes como *SOD1*, *C9ORF72*, *FUS/TLS* y *TARDBP* (Kiernan et al., 2011). *SOD1* es una enzima que se encarga de la conversión de los radicales superóxido generados en la mitocondria en peróxido de hidrogeno y oxígeno. Mutaciones en el gen que codifica para la proteína *C9ORF72* son las más comunes en pacientes con ALS familiar. En MNs rediferenciadas a partir de células de pacientes con mutaciones en este gen se determinó que se incrementan los niveles de una de las subunidades de este receptor en MNs pero no en neuronas corticales, promoviendo la entrada de calcio a las MNs y liderando un procesos de excitotoxicidad (Selvaraj et al., 2018). La proteína *FUS/TLS* es una proteína de unión a RNA que regula su metabolismo. Pérdida en la función de *FUS* puede provocar desregulación del receptor para glutamato *GluA1*. *FUS/TLS* y *TARDBP* ambas son proteínas de unión a RNA, en ALS se ha determinado que se acumulan en el citoplasma en lugar de permanecer en el núcleo, también provocan deficiencia en el transporte axonal y en vías de sobrevivencia entre muchos otros procesos celulares (Ishigaki y Sobue, 2018). Las mutaciones descritas se han utilizado para generar modelos transgénicos que permiten el estudio de los mecanismos involucrados en la degeneración de las MNs, sin embargo, estos modelos sólo representan al 10% de los pacientes. Por otro lado, aun cuando el origen de la ELAS no es claro, se han desarrollado algunos modelos no genéticos que reproducen muchas de las características fisiopatológicas de la enfermedad (Blizzard et al., 2016; Corona y Tapia, 2004; Ramirez-Jarquín et al., 2014; Ramirez-Jarquín y Tapia, 2016; Tovar-Y-Romo et al., 2007). Las principales alteraciones celulares identificadas tanto en modelos como en pacientes con ELAF y ELAS son: aumento en el estrés celular, mal plegamiento de proteínas, acumulación y deslocalización de proteínas (Gros-Louis et al., 2006) cambios

en la velocidad del transporte a través del axón, desorganización del neurofilamento, alteraciones en la estructura mitocondrial y déficit energético, presencia de glía y microglía reactiva, alteraciones en la función de los circuitos excitadores e inhibidores (Kiernan et al., 2011; Ramirez-Jarquín et al., 2014; Rothstein et al., 1990; Santa-Cruz et al., 2012). Este último punto es de nuestro particular interés, por ello, abordaremos la neurotransmisión excitadora e inhibidora que se lleva a cabo en la médula espinal y su relación con la degeneración de MNs espinales.

2.- Neurotransmisión en la médula espinal

Células en la médula espinal

La médula espinal es parte del sistema nervioso central, recibe señales aferentes y transmite señales eferentes que permiten el movimiento de los músculos del cuerpo. Está formada por materia gris y materia blanca. La materia blanca lleva ese nombre debido a que se compone de axones y células gliales, lo cual le otorga un color claro. Está dividida en tres funículos que rodean a la materia gris: funículo lateral, anterior y posterior. La materia gris adquiere esta tonalidad debido a que se compone de somas de neuronas, dendritas, células gliales y en menor medida de axones. Tiene la forma de una letra H mayúscula en donde los brazos son llamados astas dorsales y ventrales. En las astas dorsales se ubican las neuronas sensitivas. En las astas ventrales se localizan las MNs, responsables de ejercer el movimiento muscular (Watson, 2009). Acorde a sus características las MNs se clasifican en tres tipos: alfa, beta y gamma. Las MNs alfa dan lugar a axones con diámetros de entre 10 a 20 μm , que inervan a dos tipos de fibras extrafusales del músculo esquelético: las tipo FF, que se caracterizan por ser de rápida contracción pero fácilmente fatigables y las tipo FR, de rápida contracción y resistentes a la fatiga. Las MNs gamma tienen axones de 5 μm de diámetro que inervan a fibras muy pequeñas llamadas intrafusales contenidas en un saco de tejido conectivo llamado huso muscular y a las fibras musculares tipo S, que son de lenta contracción y resistentes a la fatiga. Las MNs beta envían sus proyecciones a fibras musculares extrafusales e intrafusales (Mai, 2011; Watson, 2009). Las interneuronas, células gliales y la microglia se localizan en ambas astas: dorsales y ventrales. En los segmentos lumbares de humano las interneuronas superan en número a las MNs, se ha estimado que en una rebanada de 15 μm de grosor hay alrededor de 45 interneuronas de diversos fenotipos y 20 MNs (Mai, 2011). En mamíferos, hay alrededor de 50 veces más células gliales que neuronas. Su

papel es la recaptura de neurotransmisores y iones del espacio intercelular, ayudan como medio de soporte, participan en el metabolismo energético, funcionan como guía en el crecimiento axonal y en la migración neuronal durante el desarrollo (Kandel et al., 1991).

Neurotransmisión glutamatérgica

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso. Los receptores para glutamato se clasifican en inotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos son canales permeables a cationes (Na^+ y Ca^{2+}) mientras que los receptores metabotrópicos activan enzimas intracelulares a través de proteínas G. Los receptores ionotrópicos para glutamato se dividen en tres tipos y llevan el nombre de su agonista selectivo: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y kainato (Choi, 1988).

El receptor NMDA es permeable a Na^+ y Ca^{2+} gracias a la presencia de un residuo de asparagina (aminoácido neutro) mientras que en los receptores tipo kainato y AMPA son permeables a Na^+ en mayor medida y a Ca^{2+} en menor medida. Los receptores AMPA están formados de 4 subunidades GluR1- GluR4. Las subunidades GluR1, GluR3 y GluR4 tienen un residuo de glutamina (Q) en el segundo dominio membranal, y como este es un aminoácido neutro permite la entrada de Ca^{2+} , mientras que la subunidad GluR2 tiene un residuo de arginina (R) (aminoácido con carga positiva) que le impide ser permeable a Ca^{2+} . Algunas subunidades GluR2 tienen un residuo de glutamina en vez de un residuo de arginina y esto los hace permeables a Ca^{2+} (Corona y Tapia, 2007) (Fig. 1). En la médula espinal se determinó una alta expresión de los receptores que no tienen la subunidad GluR2, es decir, en los receptores de AMPA que son permeables a Ca^{2+} (Carriedo et al., 1996).

El influjo de calcio en la célula participa en la generación de potenciales de acción, promueve la liberación de los neurotransmisores, participa como segundo mensajero en la señalización celular, entre otras funciones necesarias para mantener la homeostasis celular. Sin embargo, niveles altos de Ca^{2+} en el citoplasma pueden desencadenar procesos deletéreos, a lo cual se le conoce como excitotoxicidad.

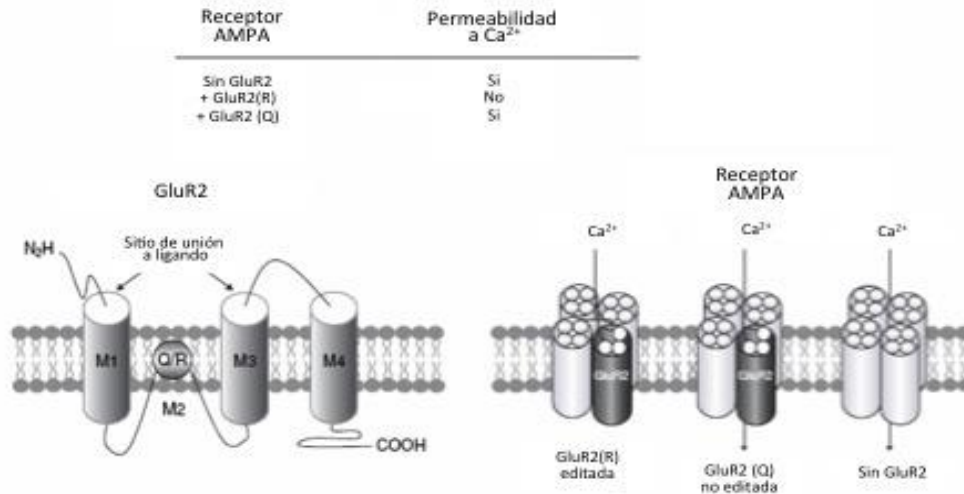


Figura 1. *Receptores para glutamato tipo AMPA.* Estructura del receptor GLUR2 y el sitio Q/R en la subunidad M2 (a la izquierda). La permeabilidad a Ca²⁺ es determinada por la ausencia o presencia de la subunidad GLUR2, o bien por la presencia de la forma GLUR2 no editada con un residuo de arginina en el sitio Q/R (a la derecha). Tomado y modificado de (Corona et al., 2007).

Excitotoxicidad

La concentración citoplasmática de Ca²⁺ en las neuronas se mantiene alrededor de 100 nM, esto ocurre gracias a dos principales sistemas de amortiguamiento; la participación de proteínas de unión a calcio y el secuestro del calcio en el retículo endoplasmático y en la mitocondria. La sobre-activación de receptores para el glutamato permite el influjo exacerbado de Ca²⁺, si el Ca²⁺ no es amortiguado puede desencadenar procesos deletéreos para la célula (Choi, 1988) como daño mitocondrial, déficit del metabolismo energético, generación de especies reactivas de oxígeno, activación de proteasas, lipasas, fosfatasas, endonucleasas y activación de caspasas y calpaínas. Todo esto puede causar alteraciones en la expresión genética, daño al citoesqueleto, acumulación de proteínas y liberación de factores pro-apoptóticos (Siesjo, 1994). Interesantemente, las MNs son muy susceptibles a la excitotoxicidad, ya que expresan una mayor cantidad de receptores tipo AMPA permeables al Ca²⁺ (Carriedo et al., 1996; Corona et al., 2007), además, su densidad mitocondrial por volumen de citoplasma es menor en comparación con las neuronas no motoras y son deficientes en proteínas de unión a Ca²⁺ como calbindina D-28K y parvalbúmina (Santa-Cruz et al., 2012).

Basados en evidencias clínicas se ha sugerido que la excitotoxicidad podría estar relacionada con la muerte de MNs en la ELA. En tejido post-mortem de corteza cerebral y médula espinal de pacientes con ELA se ha determinado una disminución en la cantidad del transportador de glutamato en comparación con el tejido de personas sanas (Rothstein et al., 1992). En otros trabajos se determinó que en el líquido cefalorraquídeo y en suero sanguíneo de pacientes existe un incremento en los niveles de aminoácidos excitadores (Malessa et al., 1991; Niebroj-Dobosz et al., 2002). De manera experimental, se demostró que un evento excitotóxico producido por la sobre-activación de receptores para glutamato tipo AMPA, puede desencadenar la muerte de las MNs en la médula espinal de rata. Además, produce activación de la glía e hinchamiento de organelos y parálisis de los cuartos traseros (Corona y Tapia, 2004; Tovar-Y-Romo et al., 2007). Estos datos son importantes antecedentes de este trabajo y se detallarán más adelante.

Neurotransmisión inhibitoria

Las interneuronas de las astas ventrales de la médula espinal modulan la actividad de las MNs y se dividen en ocho linajes: V0D, V0V, V0C, V0G, V1, V2a, V2b, V3. Las interneuronas inhibitorias provienen de los linajes V1, V2b, V0D, V0V, de entre estas las células de Renshaw y las inhibitorias recíprocas son las interneuronas que más se han estudiado y pertenecen al linaje V1. Las células de Renshaw están conectadas a las MNs mediante dos vías, en la primera su axón hace contacto con la MN y en la segunda una proyección colateral de la MN hace sinapsis con la célula de Renshaw, de esta manera cuando una MN es excitada activa simultáneamente a la respectiva célula de Renshaw quien a su vez la inhibe; a este mecanismo se le conoce como inhibición recurrente. Por otro lado, para la contracción muscular es necesario que un músculo se active y al mismo tiempo su opuesto se inhiba; esto es conocido como inhibición recíproca y son las interneuronas inhibitorias recíprocas quienes llevan a cabo esta función. En su mayoría, las proyecciones de las interneuronas hacen conexiones con otras interneuronas o MNs localizadas en el mismo lado de la médula espinal, sólo las proyecciones de las V0D y V0V mandan su axón desde el sitio ipsilateral respecto a la posición de su soma al sitio contralateral (Alvarez et al., 2005; Ramirez-Jarquín et al., 2014). Los neurotransmisores involucrados en la sinapsis inhibitoria son el ácido- γ -aminobutírico (GABA) y la glicina. La sinapsis GABAérgica ha sido asociada con el control de la actividad de redes locales en la médula espinal, es decir, comunicación dentro de los segmentos espinales, mientras que la neurotransmisión glicinérgica se ha involucrado en la comunicación entre diferentes

segmentos a lo largo de la médula espinal (Jin et al., 2003). Estudiando el papel de las sinapsis GABAérgicas y glicinérgicas en procesos de neurodegeneración, se administró en la médula espinal de rata bicuculina (bloqueador de receptores para GABA) o estriquina (bloqueador de receptores para glicina), y se determinó que sólo la administración de bicuculina provoca la muerte de neuronas motoras y déficit motor (Ramirez-Jarquín y Tapia, 2017). Tomando en cuenta este antecedente, nos enfocaremos en estudiar la participación de las sinapsis inhibitoras GABAérgicas.

3.- Ácido- γ -aminobutírico

Receptores GABAérgicos

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central en mamíferos. Se han identificado dos clases de receptores para GABA: GABA_A y GABA_B. El receptor GABA_A es un heteropentámero localizado en la postsinapsis. Se han reportado 19 genes que codifican para los 16 tipos de subunidades que lo conforman (α , β , γ , δ , ϵ y ρ), cuyo arreglo estructural forma un poro por el cual entra el Cl⁻ cuando el receptor es activado por su ligando, ocasionando que el potencial de membrana se haga más negativo, es decir, que la membrana se hiperpolarice (Olsen y Sieghart, 2008). Este receptor presenta sitios de unión para otras moléculas como: barbitúricos, benzodiazepinas, (agonistas) bicuculina, picrotoxina, gabazina, muscimol, Isogavacina (inhibidores) (McCarson y Enna, 2014). El receptor GABA_B es de tipo metabotrópico y está formado por dos subunidades, R1 y R2. En la subunidad R1 se encuentra el sitio de unión al ligando y la R2 interacciona con proteínas G_{i/o}, su función depende del tipo de proteína a la que se una y de la vía de señalización que desencadene. Algunas de las funciones que desempeña son: la apertura de canales permeables a K⁺ en la postsinapsis y la disminución del influjo de Ca²⁺ en la presinapsis (Brady y Siegel, 2012). Este receptor es activado por agonistas como baclofen y propofol, y es inhibido por antagonistas como faclofen y saclofen (McCarson y Enna, 2014).

Síntesis de GABA

El metabolismo de GABA depende principalmente de dos enzimas: la GAD y la GABA-T (aminobutirato-2-oxoglutarato aminotransferasa). La GAD cataliza la descarboxilación del ácido glutámico en su carbono α , formando GABA. La GABA-T cataliza la transaminación del grupo amino del GABA al α -cetoglutarato produciendo glutamato y semialdehído succínico. Ambas enzimas emplean al piridoxal-5'-fosfato (PLP) como coenzima. El reservorio de glutamato que actúa como sustrato para la síntesis de GABA puede provenir del glutámico que es recapturado del espacio sináptico por los astrocitos. En los astrocitos el glutamato es transaminado por la glutamina sintetasa, formando glutamina. La glutamina es liberada al espacio extracelular donde es recapturada por interneuronas, aquí la glutaminasa cataliza su desaminación formando glutamato, si la interneurona es GABAérgica el glutamato puede actuar como sustrato para la síntesis de GABA (Brady y Siegel, 2012).

Glutamato descarboxilasa

La GAD es sintetizada en interneuronas inhibitoras GABAérgicas. Existen dos isoformas de la enzima llamadas GAD65 y GAD67, de acuerdo a su peso molecular de 65 y 67 kDa, respectivamente (Martin et al., 1991). La GAD65 se encuentra en forma de apoenzima y para adquirir su función catalítica requiere unirse a su cofactor (el PLP) que se encuentra libre en el citoplasma. Por el contrario, la isoforma GAD67 permanece en forma de holoenzima, es decir, al estar unida a su cofactor se mantiene en la forma activa (Bayon et al., 1977). En humano, cada isoforma es codificada por un gen distinto, la isoforma GAD67 es codificada por el gen GAD1 localizado en el cromosoma 4 y la isoforma GAD65 es codificada por el gen GAD2 localizado en el cromosoma 10 (Erlander et al., 1991). Además de la dependencia al PLP libre, la afinidad de cada enzima por su sustrato también es distinta. En cerebro de rata, se determinó que la K_m para glutamato de GAD65 es mayor (1.41 mM) a la K_m de la GAD67 (0.33 mM), es decir, la GAD67 es más afín al sustrato que la GAD65 (Battaglioli et al., 2003).

La disposición intracelular de cada isoforma también es diferente. En cerebro de rata y ratón se determinó que la isoforma GAD67 se localiza principalmente y en mayor concentración en el citoplasma y el soma de las neuronas, por el contrario, la isoforma GAD65 se localiza principalmente y en mayor concentración en las terminales axónicas (Erlander et al., 1991; Kaufman et al., 1991). En cuanto a las similitudes conformacionales, estructura cristalizada de cada isoforma mostró que el arreglo de la

GAD65 es 71% idéntico al arreglo de la GAD67. Interesantemente, una de las diferencias más notables es el arreglo del asa catalítico. En la GAD65 el asa se encuentra desordenado, lo que ocasiona que el sitio catalítico este completamente expuesto. Por el contrario, el asa de la GAD67 se encuentra ordenado dejando cubierto al sitio activo (Fenalti et al., 2007), probablemente esta diferencia estructural esté involucrada en la afinidad de cada isoforma.

Explorando la importancia de cada isoforma, en ratón, la delección del gen que codifica a la GAD65 provocó convulsiones y ansiedad (Asada et al., 1996), mientras que la delección del gen para la isoforma GAD67 provocó que los ratones nacieran con el paladar severamente hendido y murieran durante el primer día post-natal (Asada et al., 1996). Estos resultados nos sugieren que la participación de la GAD67 es indispensable durante el desarrollo, no sólo del tejido neural sino también de tejido no neural.

La mayor parte de los estudios sobre la GAD se han realizado en el cerebro, y existen pocos datos sobre su localización y propiedades en la médula espinal. Los pocos datos existentes han demostrado que, en rata y ratón, la GAD se localiza en mayor concentración en las láminas I-III y disminuye conforme se avanza ventralmente hacia la lámina IX. En las astas ventrales ambas isoformas se ubican sólo en las terminales axónicas. El número de botones marcados con GAD67 es mayor que aquellos marcados con GAD65, e interesantemente, los botones que rodean al soma de las motoneuronas contienen principalmente a la isoforma GAD67 (Feldblum et al., 1995; Gotts et al., 2016; Mackie et al., 2003).

Piridoxal-5'-fosfato

Como ya se mencionó, el PLP es el cofactor indispensable para la actividad de la GAD. Entre los inhibidores de la enzima, están aquellos que bloquean su actividad coenzimática. Por esta razón revisaremos las propiedades de esta molécula. La vitamina B₆ existe en tres formas; piridoxina, piridoxal y piridoxamina. La fosforilación en el carbono 5 del piridoxal, reacción catalizada por la piridoxal cinasa, forma al PLP. Esta enzima está involucrada en una gran variedad de reacciones enzimáticas; en todas las reacciones de transaminación y en ciertas reacciones de descarboxilación. Como regla general se une con menor afinidad a las descarboxilasas (Du y Ryan, 2019; Dunathan, 1966). Debido a su amplia participación en el metabolismo, la deficiencia en vitamina B₆ ocasiona graves

alteraciones causando diversos síntomas como hiperirritabilidad, hiperactividad y ataques convulsivos en mamíferos (Clayton, 2006).

El mecanismo de acción del PLP se basa en la formación de una imina o base de Schiff (también denominada aldimina interna). Esta base de Schiff se forma debido a la unión del grupo aldehído del PLP con el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina, propio de la enzima dependiente de PLP. Esta interacción es de tipo covalente. Cuando el sustrato se une a la enzima, su grupo amino desplaza al complejo Lys- ϵ -amino, proceso conocido como transaldiminación. Esta reacción conduce a la formación de un complejo nuevo, formado por el sustrato y el PLP, denominado aldimina externa, en la cual se produce la escisión de uno de los tres enlaces del carbono α , resultando en la eliminación del grupo carboxilo. En la mayoría de los casos, el PLP actúa como un “sumidero de electrones” para estabilizar el carbanión, un estado denominado quinoide intermedio, formado después de la escisión del enlace del carbono α (Fig. 2), (Du y Ryan, 2019). En el caso de la descarboxilación que se lleva a cabo en la síntesis del GABA, el sustrato aminado es el ácido glutámico y la enzima a la que le pertenece el residuo de lisina es la GAD. El resultado final de la reacción es la ruptura del enlace del carbono α del glutamato, liberándose como CO_2 , lo que origina al aminoácido de cuatro carbonos, el GABA.

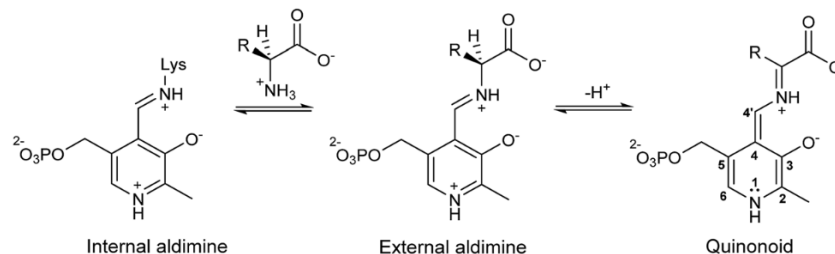


Figura 2. Mecanismo de acción del PLP en una reacción de descarboxilación. El grupo aldehído del PLP forma un doble enlace con el grupo amino de la enzima, formando una aldimina interna o base de Schiff. En el siguiente paso la amina del sustrato desplaza el complejo Lys- ϵ -amino formando un nuevo complejo formado por el sustrato y el PLP llamado aldimina externa, el enlace del carbono α se rompe y se libera el grupo α carboxilo. En la mayoría de los casos, el PLP actúa como un “sumidero de electrones” para estabilizar el carbanión, un estado denominado quinoide intermedio (Du y Ryan, 2019).

Inhibidores farmacológicos de la actividad de la GAD usados en este trabajo

La actividad de la GAD puede ser afectada por la presencia de inhibidores competitivos como el MPA o bien por agentes que bloquean la función coenzimática del cofactor, como la TSC o sustancias que intervienen con la actividad de la piridoxal cinasa como es el caso de la PLPGH.

El MPA es una molécula de estructura similar a la del glutamato, debido a esto inhibe a la actividad de la GAD acoplándose al sitio de unión del sustrato e impidiendo la unión del glutamato (Tunnicliff, 1990). La administración de MPA directamente en el cerebro (caudado) provoca movimientos involuntarios de manera transitoria, sin dañar la estructura celular (Toth E., 1988). En otros experimentos, su administración sistémica produce convulsiones (Lamar, 1970) en ocasiones acompañadas de daño celular (Towfighi et al., 1989). Administrado directamente en el hipocampo de rata produce convulsiones y muerte celular (Salazar y Tapia, 2015).

La TSC interacciona con el grupo aldehído del PLP formando un doble enlace carbono nitrógeno. Esta unión impide que el cofactor interaccione con la GAD65, con esto se disminuye la concentración del PLP disponible y ocasiona la inhibición de la enzima, es decir, funciona como un bloqueador de la función coenzimática del cofactor. Los inhibidores con este mecanismo de acción se les conoce como agentes atrapadores del grupo carbonilo (Abe y Matsuda, 1979; Horton, 1980). En ratón, la administración intraperitoneal de TSC produce convulsiones y disminuye la actividad de la GAD medida en el cerebro (Abe y Matsuda, 1979). En pollo, cuando se administra de manera intramuscular también disminuye la actividad de la GAD en el cerebro (Wood, 1971).

Algunas hidrazidas inhiben la actividad de la GAD como resultado de su interacción con el grupo aldehído del PLP, mientras que otras inhiben fuertemente la actividad de la piridoxal cinasa. Como es el caso del ácido glutámico- γ -hidrazida (GAH, γ -glu-NHNH₂), un agente atrapador del grupo carbonilo. La administración a altas concentraciones de la GAH inhibe a la actividad del cofactor y por ello afecta a la actividad de ambas enzimas, la GAD y la GABA-T, debido a esto, produce convulsiones y ocasiona un aumento en los niveles de GABA (G H Massieu et al., 1962; Tapia y Awapara, 1969). Interesantemente, con el objeto de revertir los efectos de la inhibición de la GAD, en ratón

se administró simultáneamente GAH y PLP. Contrario a lo esperado, produjo un aumento en la inhibición de la GAD, en las convulsiones y disminuyó los niveles de GABA (Tapia et al., 1967) lo que llevó a proponer que la GAH forma un enlace con el grupo aldehído del PLP, formando un doble enlace carbono nitrógeno, el resultado de esta unión es el piridoxal fosfato- γ -glutamil hidrazona (PLPGH). Para comprobar lo anterior, en ratón se administró GAH o PLPGH por separado, ambos tratamientos causaron convulsiones, inhibición de la actividad de la GAD y disminución en los niveles de GABA, sorprendentemente en la misma proporción (Tapia y Awapara, 1969; Tapia et al., 1967). Por otro lado, la administración intraperitoneal de PLPGH en rata adulta sana no produjo convulsiones, pero sí lo hizo cuando se administró en ratas adultas con cirrosis (Diaz-Munoz y Tapia, 1988).

En resumen, el MPA inhibe a ambas isoformas, la GAD65 y la GAD67, mientras que la TSC o PLPGH inhiben principalmente a la actividad de la isoforma GAD65. La relevancia de cada isoforma no ha sido estudiada en los circuitos inhibidores de la médula espinal de rata.

4.- Alteraciones en las sinapsis excitadoras e inhibitoras y su relación con la degeneración de MNs

El fenómeno de excitotoxicidad que se mencionó arriba, podría originarse debido a un incremento en la actividad de las sinapsis excitadoras o bien podría ser causado por una disminución en la actividad de las sinapsis inhibitoras.

En pacientes y modelos transgénicos de ELA se han determinado evidencias de alteraciones celulares que posiblemente alteran el equilibrio entre la funcionalidad de las sinapsis excitadoras e inhibitoras. En este sentido, en cerebro post-mortem de pacientes con ELA se identificó una disminución en la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A y un aumento en la GAD localizada en la corteza temporal y frontal de pacientes con ELA (Petri et al., 2006). En tejido *post-mortem* de corteza cerebral y médula espinal de pacientes con ELA se encontró un decremento del transportador GLT1 (transportador de glutamato en astrocitos) (Rothstein et al., 1992; Rothstein et al., 1995)

Si el glutamato no se elimina del espacio sináptico podría activar excesivamente a las neuronas motoras, provocando excitotoxicidad. Sin embargo, en nuestro laboratorio la administración de PDC (L-2,4-trans-pirrolidina-dicarboxilato), un bloqueador del transporte de glutamato no selectivo, en la médula espinal de rata, no produce alteraciones

conductuales ni celulares (Corona y Tapia, 2004). La administración de PDC o de TBOA (DL-treo-b-benciloxilaspartato) de manera crónica en la médula espinal de rata fue inocua para las MNs, a pesar de que los niveles extracelulares de glutamato incrementaron cuatro veces respecto a los medidos en el tejido del grupo control (Tovar-Y-Romo et al., 2009). Por el contrario, en la médula espinal de rata la administración aguda o crónica de AMPA o kainato (agonistas de glutamato) produce alteraciones en la conducta motora y pérdida de MNs localizadas en el sitio de infusión (Corona y Tapia, 2004). En conclusión, si bien la acumulación de glutamato no produce degeneración de MNs, la administración de un agonista sí lo hace. La degeneración observada se relacionó con el hecho de que las MNs de la médula espinal son particularmente vulnerables a la activación de los receptores tipo AMPA permeables a Ca^{2+} , y con ello a la degeneración por el influjo de Ca^{2+} tanto in vivo como in vitro (Corona y Tapia, 2007; Van Den Bosch et al., 2000). Para comprobar que la entrada de Ca^{2+} es la responsable de la degeneración de las MNs, en nuestro laboratorio se determinó que la co-administración de AMPA con NAS (1-naftil acetil espermina), un bloqueador selectivo de receptores tipo AMPA sin subunidad GluR2, o BAPTA-AM (un quelante de calcio), previno el déficit motor y la pérdida de neuronas motoras en la médula espinal de rata (Corona y Tapia, 2007).

Para abordar el posible papel de las sinapsis inhibitoras en la médula espinal de rata, se administró bicuculina de manera crónica durante 10 días. Este tratamiento produjo alteraciones motoras en la pata ipsilateral a la administración, movimientos involuntarios transitorios y pérdida de MNs del sitio de infusión. La co-administración de CNQX (bloqueador de receptores para glutamato tipo AMPA) previno tanto las alteraciones motoras como las celulares. Estos resultados sugieren la participación de un evento excitotóxico como resultado de la disminución en la actividad de las sinapsis inhibitoras GABAérgicas (Ramirez-Jarquín y Tapia, 2017).

En otros experimentos, en hipocampo de rata (CA1) se administró MPA, TSC o PLPGH. Sólo el tratamiento con MPA produjo movimientos involuntarios identificados como sacudidas de rata mojada, epilepsia, decremento en los niveles de GABA y un 80% de muerte neuronal en el área administrada. Interesantemente, la administración sistémica de MK-801 (bloqueador de receptores para NMDA) no previno los signos de hiperexcitabilidad pero sí previno el daño neurotóxico. Estos resultados sugieren que la degeneración fue ocasionada por un proceso de excitotoxicidad mediada por la sobre-activación de receptores de NMDA, como resultado de un decremento funcional en los circuitos inhibitoros (Salazar y Tapia, 2015). Es importante resaltar que la administración

de los inhibidores que afectan exclusivamente a la actividad de la isoforma GAD65 fue inocua (TSC y PLPGH), mientras que la administración de MPA, que inhibe a ambas isoformas GAD65 y GAD67, provocó alteraciones conductuales y celulares. Lo cual sugiere que esta isoforma tiene un papel más relevante que la GAD65 en el equilibrio de las sinapsis inhibitoras del hipocampo.

IV.- Hipótesis

Basados en los antecedentes expuestos y en los trabajos en donde se disminuyó la neurotransmisión inhibitora en el hipocampo y en la médula espinal, proponemos que la administración de inhibidores de la enzima GAD administrados en médula espinal mediante microdiálisis y mini-bomba osmótica producirán hiperexcitabilidad y degeneración de MNs espinales, relacionados con un evento de excitotoxicidad.

V.- Objetivo

Con la finalidad de comprobar nuestra hipótesis el objetivo general de este trabajo fue determinar si los inhibidores de la enzima GAD administrados en médula espinal mediante microdiálisis y mini-bomba osmótica pueden producir o no hiperexcitabilidad y degeneración de MNs espinales, relacionados con un evento de excitotoxicidad.

Objetivos particulares

- Evaluar los efectos de la administración aguda y crónica de MPA, TSC y PLPGH en la conducta motora.
- Cuantificar a las MNs y el área correspondiente a astrocitos en la médula espinal de las ratas tratadas con los inhibidores.
- Medir la actividad de GAD en el tejido de las ratas administradas crónicamente con los inhibidores.

VI.-Método

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de entre 280 y 300 g. Se mantuvieron en un ambiente de laboratorio con ciclos de luz/oscuridad de 12h y con alimento y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron con la aprobación del comité local de cuidados animales con número de aprobación RT121-14.

Reactivos

La PLPGH fue sintetizada como se describió previamente (Tapia et al., 1967) a partir del ácido L-glutámico γ -hidrazida y piridoxal-5'-fosfato. Se comprobó su pureza por espectrofotometría (el espectro de absorción en 0.1 M en buffer de fosfatos con pH 6.3 mostró un pico a 325 m μ que corresponde a la piridoxamina fosfato, debido al enlace C-N en posición 4 del piridoxal 5 fosfato), de acuerdo con el trabajo citado. Los inhibidores MPA (107-96-0) y TSC (79196) se adquirieron de Sigma-Aldrich, el ácido glutámico L-(-14 C) (ARC0240 actividad específica 281000 μ Ci/ 1000 μ mol) se adquirió de ARC, el hidróxido de hiamina (26248-39-5) fue obtenido de Research Products International, los anticuerpos contra SMI-32 (801701) y GFAP (Z0334) de Biolegend y DakoCytomation, respectivamente.

Modelo de administración aguda mediante microdiálisis

La cirugía para el modelo de administración agudo se realizó de manera similar a como se describió en (Corona y Tapia, 2004). Las ratas se anestesiaron con isoflurano en una mezcla que contenía 95% de oxígeno y 5% de CO₂ y se mantuvo a un flujo continuo de 2% de isoflurano durante todo el procedimiento. La cirugía se realizó sobre un estereotáxico, se rasuró la zona lumbar de la columna vertebral y se realizó un corte vertical sobre la piel en dirección rostro caudal de aproximadamente 3 cm de longitud seguido de dos cortes paralelos a la columna vertebral que nos permitió montarla sobre soportes especiales para médula espinal. Se identificó la segunda vertebra que corresponde al segmento lumbar L4, y se despejó el tejido muscular que la recubre. Se realizó un trepano sobre el piso de la vertebra del lado izquierdo y se colocó con suavidad un tornillo de acero inoxidable de 1.5 mm de diámetro. Sobre el piso de la vertebra en el lado derecho se realizó una laminectomía parcial de aproximadamente 2 mm de diámetro, cuidadosamente se rompieron las 3 meninges (piamadre, dura madre y aracnoides). Posteriormente, usando una torre para estereotáxico, sobre la médula expuesta se colocó una cánula para microdiálisis modelo CM7 y se insertó a 1 mm de profundidad. La cánula está conectada a dos mangueras, la primera administra y la segunda recolecta por intercambio osmótico los solutos del espacio extracelular. El flujo de la microdiálisis se mantuvo a 2 μ l por minuto, los solutos se recolectaron en tubos (25 μ l por tubo). Se administró medio Krebs (vehículo) durante 1 h como periodo de estabilización, posteriormente se administraron 75 μ l del mismo vehículo como periodo basal (momento en que comenzamos a recolectar los solutos en cada tubo), posteriormente se

administraron 125 μ l del respectivo inhibidor disuelto en medio Krebs y finalmente 50 μ l de medio Krebs como periodo de lavado. Al término del procedimiento, las ratas fueron suturadas y colocadas en cajas individuales.

Modelo de administración crónica mediante mini-bombas osmóticas.

La cirugía para el implante de la mini-bomba osmótica se realizó de manera muy similar como se describe en (Tovar-Y-Romo et al., 2007). Se utilizaron mini-bombas osmóticas marca ALZET modelo 2004 que constan de tres membranas, la más externa es rígida y permeable, lo que permite el ingreso del líquido extracelular del medio donde se implanta, la segunda membrana es flexible y absorbe el líquido que ingresa por la primera membrana, con esto se hincha y empuja a la tercera membrana que funciona como reservorio y contiene al fármaco, expulsándolo a un flujo continuo de 0.25 μ l por hora (6 μ l por día). El procedimiento quirúrgico se realizó tal como se describe arriba hasta el punto de la laminectomía sobre el lado derecho del piso de la vértebra. Se colocó una cánula sobre la médula espinal despejada sosteniéndola con una torre para estereotáxico inclinada a 25 grados. Se insertó a dos mm de profundidad, una vez colocada la cánula se agregó cemento dental para fijarla. La cánula se conectó con la bomba ALZET (colocada subcutáneamente en la espalda de la rata), esta unión se selló con pegamento instantáneo (cianocrilato). Finalmente la incisión inicial se cerró utilizando grapas quirúrgicas, al despertar de la anestesia la rata se colocó en una caja individual.

Rotarod

Para realizar esta prueba entrenamos a las ratas durante una semana previa a la cirugía, de esta manera las ratas consiguieron permanecer 120 s sobre el rotarod. El test consiste en un cilindro que gira a una velocidad inicial de 10 r.p.m. y aumenta de manera constante 0.2 r.p.m/seg. Cada rata realizó tres repeticiones y el promedio se consideró como la evaluación del día. La prueba se realizó antes y 24h después de la cirugía (tratamiento agudo) o antes y cada día después del implante de la mini-bomba osmótica durante 10 días (tratamiento crónico) (Fig.3A).

Prueba de la escalera

Consiste en medir los errores y el tiempo que tarda una rata en cruzar una serie de barras (escalera) de 5 mm de grosor y 2 cm de separación. Definiendo como errores cada ocasión en que algún miembro posterior resbala de los peldaños. La escalera mide 40 cm

de largo y está rodeada por un pasillo transparente de 10 cm de ancho x 10 cm de alto. La prueba se realizó antes y 24 h después de la administración aguda o antes, al quinto y al décimo día después del implante de la mini-bomba osmótica (Fig.3B).

Registro del patrón de la zancada

Esta prueba nos permite observar la forma y el patrón de la pisada de la rata durante la marcha. Para ello, la región plantar del miembro posterior derecho (ipsilateral) se pinta de color rojo y el izquierdo (contralateral) de color negro, las ratas caminan a lo largo de un pasillo (10 cm ancho x 60 cm largo x 10 cm alto), cuyo piso está cubierto por papel blanco. Esta prueba es únicamente cualitativa y se realizó una sola vez por rata antes y 24 h después de la cirugía (administración aguda) o antes, al tercer, quinto y décimo día después de colocar el implante (administración crónica) (Fig.3C).

Registro de la tensión ejercida por las falanges

El registro de la tensión ejercida por las falanges (RTF) se realizó mediante una nueva técnica desarrollada en nuestro laboratorio, como se describe en (Colin-Martinez, 2018). La prueba permite medir la capacidad motora de los músculos correspondientes a las falanges, el metatarso y el tarso de los cuartos traseros de la rata. La prueba consiste en levantar a la rata por la cola dejando libres sus patas posteriores, en ese momento se le acerca un bulbo de látex el cual presiona con las falanges. El bulbo está conectado a un tubo lleno de agua que a su vez se conecta a un transductor de fuerza adaptado para que detecte los cambios en el volumen de agua del interior. Durante el registro se obtiene una línea plana que se deflexiona cuando el volumen de agua aumenta como resultado de presionar el bulbo. La curva generada se cuantifica en gramos, calculados a partir de una calibración previa del transductor con una pesa de 10 gramos. Esta cuantificación es realizada por el sistema de adquisición y digitalización en tiempo real MP100 y el programa Acqknowledge 3.7.1, que permiten la captura de los datos de área y amplitud de cada curva. El área representa los gramos que fueron desplazados por segundo y la amplitud indica los gramos desplazados en el punto máximo de presión. La prueba se realizó por triplicado para cada miembro, el promedio registrado por cada pata se consideró como la evaluación del día. En el grupo del tratamiento agudo la prueba se realizó antes y 24 h después de la administración, mientras que en el grupo del modelo crónico se realizó antes, al quinto y al décimo día después del implante (Fig. 3D,E).

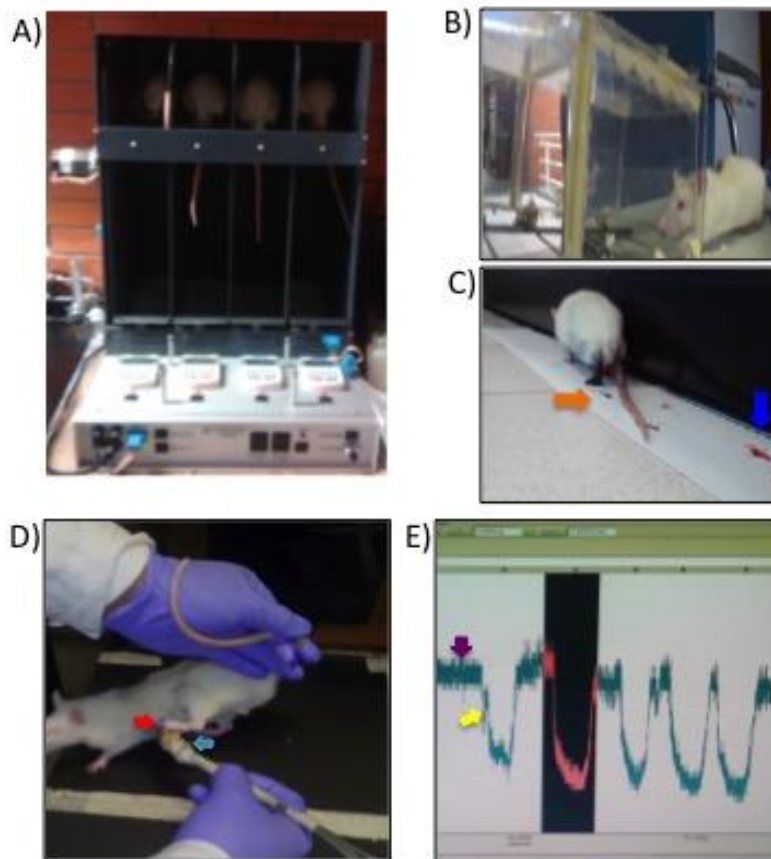


Figura 3. Pruebas motoras empleadas en el estudio. A) Rotarod. B) Escalera. C) Registro del patrón de la zancada. D) Rata control presionando el bulbo de registro (flecha azul) con las falanges de la pata izquierda (flecha roja). E) Digitalización en tiempo real de la tensión ejercida por las falanges mostrada en D. Durante el registro en reposo se obtiene una línea (flecha morada) y la presión del bulbo produce la curva (flecha amarilla) cuya amplitud y área dependen de la intensidad y duración de la presión aplicada al bulbo, como se observa en resultados.

Tinción con violeta de cresilo e inmunohistoquímica

Al término del tratamiento las ratas fueron sacrificadas y fijadas por perfusión intracardíaca con paraformaldehído al 4% disuelto en PB (buffer de fosfato de sodio) a 0.1 M, de cada rata se obtuvo la médula espinal lumbar del sitio en el que se administraron los inhibidores o el vehículo y se deshidrató en gradientes de sacarosa al 10, 20 y 30% a lo largo de una semana. Se obtuvieron cortes de 40 μm grosor en un criostato que se procesaron para tinción de violeta de cresilo como se describe en (Watson C., 2009). Se cuantificó el número de MNs sanas del lado izquierdo (contralateral a la administración) y derecho (ipsilateral a la administración) de la médula. Los criterios para considerar a una MN como sana fueron: tamaño alrededor de 20 μm , núcleo visible y localización en el asta ventral. Se contaron las MNs de 30 cortes, en 20 de ellos el sitio en el que se insertó la cánula era visible y el resto fueron de un poco más caudal y rostral en torno al sitio de lesión. De la misma zona se procesaron tres cortes para inmunohistoquímica. Se

identificaron a las MNs empleando como anticuerpo primario contra SMI-32 (1:500) y como anticuerpo acoplado a fluoróforo se usó Alexa 546. Para identificar a los astrocitos se usó el anticuerpo contra GFAP (1:1000) y el anticuerpo acoplado a fluoróforo FITC. Utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 se tomó una micrografía de cada asta ventral con 10 campos de profundidad cada una. El área correspondiente a la marca de GFAP se cuantificó usando el programa ZEN 2 blue edition, el cual permite la cuantificación de la superficie marcada al exponer la muestra a cada láser. De esta manera, se obtuvo el promedio de la superficie marcada con GFAP en las astas ventrales de tres cortes por cada rata. La superficie marcada con SMI-32 no se cuantificó, esta marca sólo se utilizó para ver cambios en la disposición del citoesqueleto.

Medición de la actividad de la GAD

Para medir la actividad de la GAD se utilizó el método isotópico que se describe en (Diaz-Munoz y Tapia, 1988) con algunas modificaciones. Al término del tratamiento las ratas se eutanizaron por medio de decapitación y se obtuvo el tejido de la médula espinal correspondiente al sitio de lesión. Se midió 0.5 cm de largo tomando como centro el sitio en que se insertó la cánula, se realizó un corte sobre la marca del surco medio para dividir a la médula en dos regiones, ipsilateral y contralateral. Se separó el asta dorsal de la ventral en cada caso y esta última se homogenizó en 400 μ l de PB a 50 mM con ditiotritol 1.13 mM a pH de 6.5. Del homogenizado se tomaron 6 μ l para medir el contenido de proteínas de acuerdo al método de Lowry y 80 μ l se utilizaron como fuente de la enzima para medir la actividad enzimática de la GAD. El tubo del medio de incubación contenía 80 μ l del homogenizado, 20 μ l de PB 50 mM, 20 μ l de PLP 0.5 mM y 20 μ l de una mezcla que contenía 0.1 μ Ci de glutamato marcado en el carbono α con 14 C (ARC0240 actividad específica 281000 μ Ci/ 1000 μ mol) y glutamato frío a 10 mM. El tubo se conectó a una manguera de látex que a su vez se conectó a un segundo tubo que contenía 140 μ l de hidróxido de hiamina 1M disuelto en metanol. La reacción se incubó dentro de un baño a maría a 37 grados por 20 min en agitación continua. Al término se detuvo la reacción inyectando 100 μ l de H_2SO_4 a 2N al medio de incubación a través de la manguera. Se mantuvo en incubación con las mismas condiciones mencionadas arriba durante una hora para permitir que el $^{14}CO_2$ liberado reaccionara con el hidróxido de hiamina. El tubo con hidróxido de hiamina se colocó dentro de un vial con 15 ml de líquido de centelleo y las cuentas por minuto se leyeron en un contador de centelleo. La reacción control contenía exactamente lo mismo que los medios de incubación del tejido en tratamiento, pero el

homogenizado se hirvió durante 5 min para desnaturalizar las proteínas. La actividad de la enzima se reportó en pmoles de $^{14}\text{CO}_2$ producido por mg de proteína.

VIII.- Resultados

1.- Administración aguda por microdiálisis de inhibidores de la glutamato descarboxilasa.

La administración aguda de MPA 20 mM, TSC 15 o PLPGH 25 mM no altera la conducta motora.

La primera parte de nuestro proyecto fue evaluar los efectos conductuales y celulares ante la administración aguda de cada uno de los inhibidores y del medio fisiológico Krebs usado como vehículo. Determinamos que ni la administración en la médula espinal de 125 μl de cada inhibidor (MPA 20 mM, TSC 15 mM o PLPGH 25 mM) ni la administración del vehículo provocó alteraciones motoras visibles en ningún momento después de la administración y hasta 24h. En la prueba de rotador, el grupo control tardó 120 s en caer antes y 24h después de la cirugía (Fig.4A, círculos negros). El grupo administrado con MPA 20 mM tardó 119 s en caer del cilindro antes de la cirugía y 109 s 24h después del tratamiento (Fig.4A, triángulos rojos). El grupo administrado con TSC 15 mM tardó 120 s antes de la cirugía y 24h después tardó 109 s (Fig. 4A, rombos amarillos). El grupo administrado con PLPGH 25 mM tardó 120 s antes de la cirugía y 111 s 24h después (Fig.4A, círculos azules). Ninguno de estos valores fue significativamente diferente respecto al grupo control.

En la prueba del registro del patrón de la zancada, 24h después de la administración de cada inhibidor o el vehículo, se observaron las cinco falanges extendidas (Fig. 4B, medios círculos rojos) tanto en la pata ipsilateral (huella de color rosa) como en la contralateral (huella de color negro), características de una pisada sin déficit motor.

Por otro lado, en la prueba de la escalera, a pesar de que todas las ratas se entrenaron durante una semana antes de la cirugía, todos los grupos mostraron una ligera tendencia a incrementar el tiempo que tardaron en cruzar (Fig. 4C) incluido el grupo control. El tiempo que tardó el grupo tratado con PLPGH 25 mM fue significativamente mayor respecto al tiempo que tardó este mismo en cruzar antes de la cirugía (Fig. 4C,

barras azules), pero no fue significativo respecto al tiempo que tardó en cruzar el grupo control evaluado 24h después de la administración del vehículo (Fig. 4C, barra negra). Consideramos este aumento no representa una alteración motora provocada por la administración del inhibidor, debido a que el grupo control también presentó un ligero aumento. En cuanto a las fallas realizadas al atravesar la escalera, tanto el grupo control como el administrado con MPA presentaron una tendencia a aumentar (Fig.4C, barras negras y rojas) mientras que los grupos con TSC y PLPGH mostraron una ligera disminución en el número de fallas (Fig. 4C, barras amarillas y azules), ningún valor fue estadísticamente diferente respecto al grupo control después de la administración del vehículo ni lo fue respecto a los valores de cada grupo antes de la cirugía. El número de fallas al cruzar la escalera varía entre cada individuo y no se consiguió que en el tiempo cero (d0, antes de la cirugía) todas las ratas realizaran el mismo número de errores.

La prueba RTF, se caracteriza por su alta sensibilidad a las alteraciones motoras en los músculos distales de los cuartos traseros. La amplitud promedio del grupo control registrada antes y después de la cirugía fue de ≈ 0.29 a 0.32 g en cada miembro posterior (Fig. 5A,B). En cuanto a la amplitud registrada por las ratas administradas con los inhibidores antes y después de la cirugía fue de ≈ 0.31 a 0.34 g en cada miembro (Fig. 5A,B). En cuanto al área promedio registrada por el grupo control antes y después de la cirugía fue de ≈ 0.99 a 1.13 g/s en cada miembro (Fig. 5C,D). El área registrada por las ratas administradas con los inhibidores antes y 24h después de la cirugía fue de ≈ 0.86 a 1.17 g/s en cada miembro (Fig. 5C,D). Ninguno de estos valores fue significativamente diferente, ni respecto al grupo control ni entre el registro de la pata opuesta del mismo grupo.

En resumen, ni la prueba rotarod, la cual evalúa principalmente la motricidad de los músculos proximales de los cuartos traseros, ni las pruebas “registro del patrón de la zancada” o RTF, que evalúan a los músculos más distales de los miembros posteriores, registraron alteraciones motoras en las ratas tratadas con los inhibidores mediante microdiálisis.

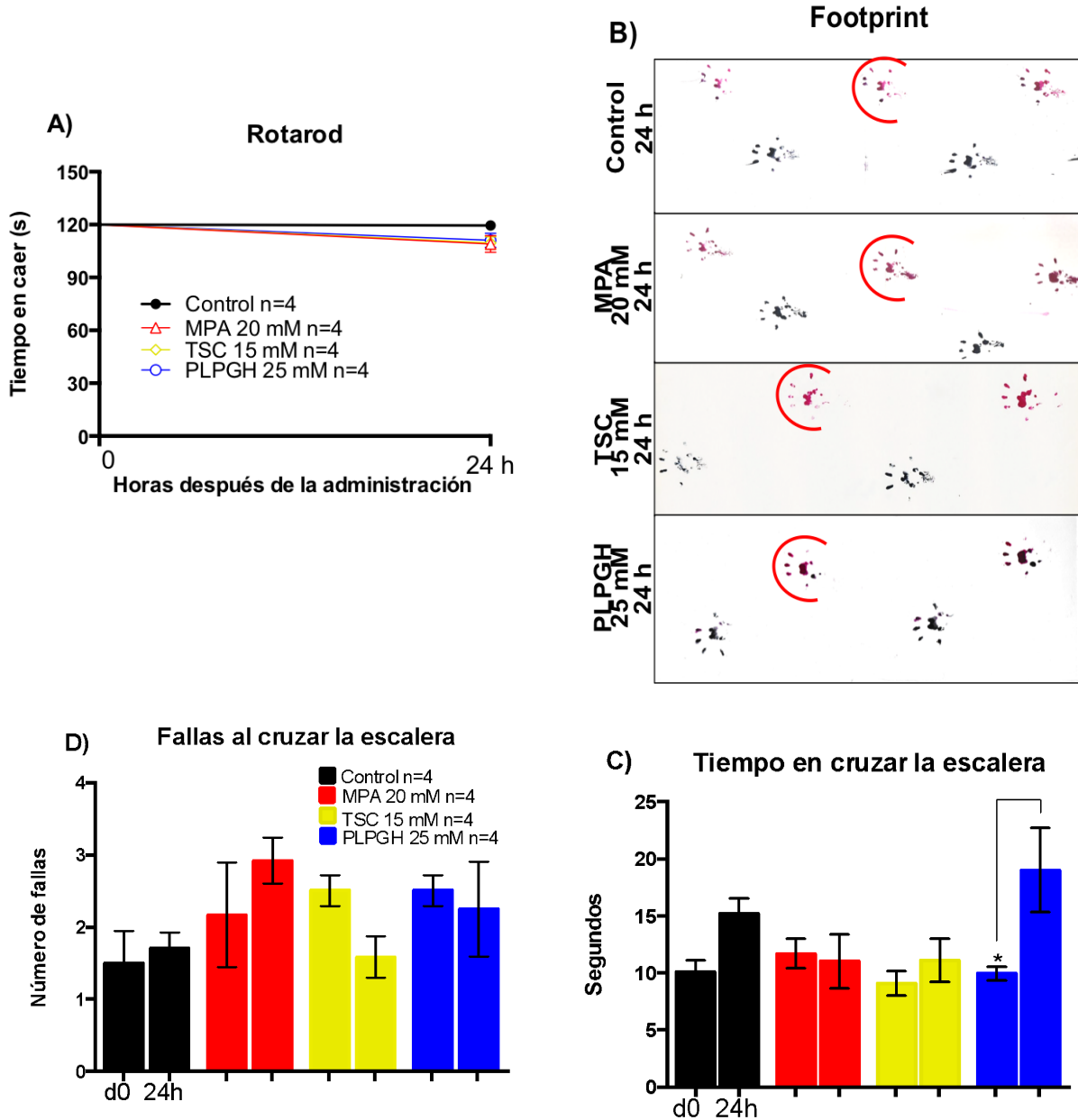


Figura 4. Conducta motora de ratas administradas agudamente con MPA 20 mM, TSC 15 mM, PLPGH 25 mM o vehículo. A) Rotarod antes y 24 horas después de la cirugía. B) Registro del patrón de la zancada 24 horas después de la administración, las huellas color de rosa corresponden a la pisada del miembro ipsilateral al sitio de administración y las de color negro al miembro contralateral, los medios círculos señalan las cinco falanges extendidas, características de una pisada sin déficit motor. C, D) Tiempo y número de fallas al cruzar la escalera evaluado antes y 24 horas post-cirugía. Los valores corresponden a la media \pm el error estándar de cada grupo. ANOVA de una vía, * $p < 0.01$

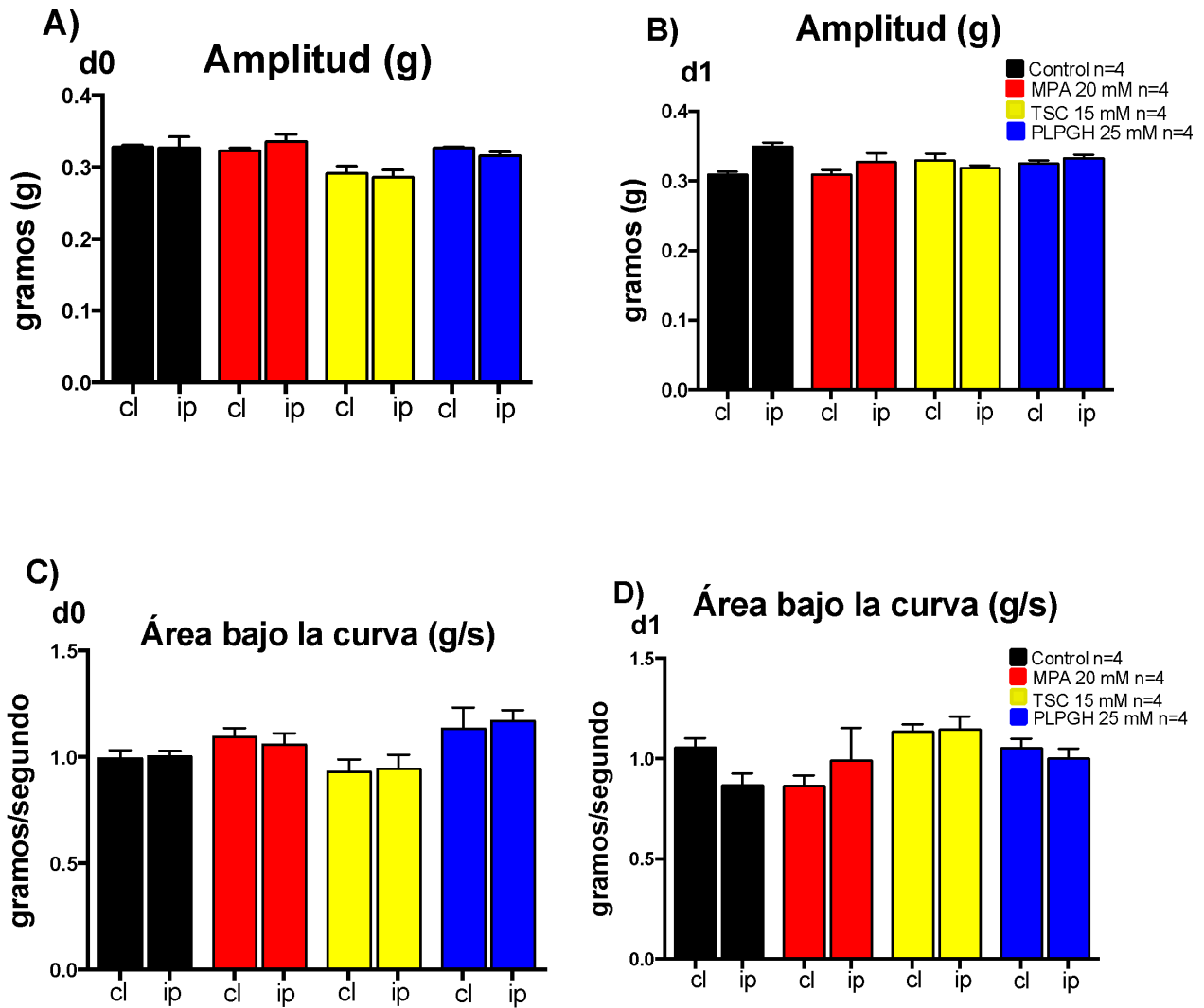


Figura 5. Tensión ejercida por los músculos de las falanges de ratas tratadas agudamente con MPA 20 mM, TSC 15 mM, PLPGH 25 mM o vehículo. A,B) Amplitud promedio registrada por los miembros contralateral e ipsilateral antes de la cirugía (d0) y 24h después (d1). C,D) Área promedio registrada antes de la cirugía y 24h después. Los valores se muestran como la media \pm el error estándar de cada grupo. Ip, ipsilateral, cl, contralateral. Ningún caso fue significativamente diferente a los datos del grupo control. Analizado con ANOVA de una vía.

La administración aguda de los inhibidores no altera el número de MNs espinales.

Las ratas se perfundieron 24h después de la administración y el tejido se procesó para el análisis histológico como se describe en los métodos. Se cuantificó el número de motoneuronas en cada lado de la médula espinal y se comparó con el número de motoneuronas del tejido del grupo control. El número de motoneuronas cuantificado en cada asta ventral del tejido de los grupos tratados con los inhibidores fue muy similar al cuantificado en el grupo control. En la figura 6A podemos observar en el panel central una micrografía de un corte transversal de la médula espinal, representativo de cada grupo, en un aumento de 4x. De lado derecho se muestra una micrografía en aumento de 20x del asta ventral ipsilateral correspondiente a la micrografía del centro y en el lado izquierdo se muestra un aumento del asta ventral contralateral. El número de MNs en la región lumbar del lado contralateral de cada grupo fue el siguiente: control 19 ± 1.2 MNs, MPA 20 mM 17 ± 0.9 MNs, TSC 15 mM 20 ± 0.6 MNs y PLPGH 20 mM 20 ± 0.3 MNs (Fig. 6B). En el lado ipsilateral el número de MNs fue: control 18 ± 0.8 MNs, MPA 20 mM 15 ± 0.9 MNs, TSC 15 mM 17 ± 0.4 MNs, PLPGH 25 mM 18 ± 0.3 MNs (Fig. 6B). Ninguno de estos valores fue significativamente diferente respecto a su lado homónimo de la médula del grupo control ni comparado con el lado opuesto de cada grupo.

Los resultados conductuales e histológicos obtenidos indican que la administración aguda de inhibidores de la GAD en la médula espinal no altera ni la capacidad motora ni la sobrevivencia de las MNs. Posiblemente debido a que se requiere de un mayor tiempo de exposición a los inhibidores para que estos ejerzan alguna alteración notable.

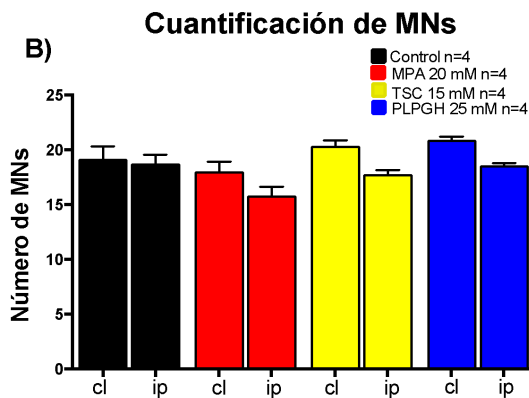
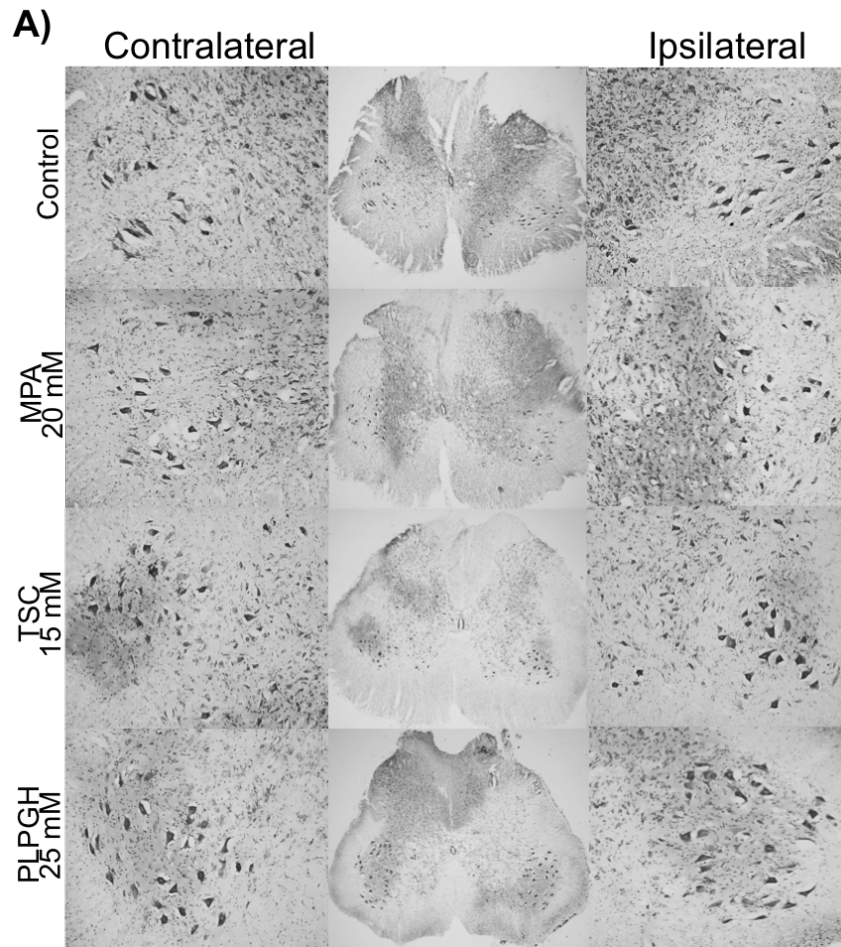


Figura 6. Cuantificación de MNs de la región lumbar de ratas administradas agudamente con MPA 20 mM, TSC 15 mM, PLPGH 25 mM o vehículo. A) Micrografías representativas, en todos los casos al centro se muestra una micrografía de un corte transversal de la médula espinal del sitio de administración, a la derecha un aumento del asta ipsilateral respectiva y en el lado izquierdo un aumento del asta contralateral. B) El número de MNs teñidas con violeta de cresilo no fue significativamente diferente respecto a las MNs en el tejido del grupo control. Ip, ipsilateral, cl, contralateral. Los valores se muestran como la media \pm el error estándar de cada grupo. Analizado con ANOVA de una vía.

2.- Administración crónica de inhibidores de la glutamato descarboxilasa en la médula espinal durante 3 días.

La administración de inhibidores de la GAD de manera crónica durante 3 días produce déficit motor en los músculos distales de los cuartos traseros.

Dado que la administración aguda de los inhibidores resultó inocua tanto en la conducta motora como en la morfología celular de las MNs, decidimos aumentar el tiempo de exposición a los inhibidores, la administración se realizó durante 3 días mediante mini-bombas osmóticas. Se utilizaron las mismas concentraciones empleadas en el tratamiento agudo; MPA 20 mM, TSC 15 mM y PLPGH 25 mM. A diferencia del tratamiento agudo, el crónico provocó alteraciones motoras caracterizadas como flacidez en los músculos correspondientes a las falanges y el metatarso de los miembros posteriores. Estas alteraciones fueron evidentes desde el primer día de tratamiento (24 horas después de la colocación de la mini-bomba). Interesantemente, algunas ratas desarrollaron movimientos involuntarios caracterizados como mioclonías transitorias en los cuartos traseros, principalmente en el miembro ipsilateral a la administración y en algunos casos en el miembro contralateral. Estos movimientos se presentaron en alguno de los tres días de tratamiento y se observaron al momento o inmediatamente después de que las ratas fueron evaluadas en la prueba del rotarod. La duración de los movimientos involuntarios fue distinta para cada rata pero en general ocurrieron durante 30 a 60 minutos. Debido a que las ratas no estuvieron bajo observación continua, desconocemos la incidencia exacta de las mioclonías.

La prueba de rotarod se realizó cada día después del implante de la mini-bomba osmótica, durante el registro las ratas administradas con los inhibidores apoyaban el metatarso y el tarso del miembro ipsilateral y mantenían las falanges estiradas, por el contrario las ratas administradas con vehículo apoyaron las falanges en ángulo y el inicio del metatarso. Estas alteraciones en la pisada ocasionaron que las ratas tratadas con inhibidor permanecieran menos tiempo sobre el rotarod respecto al tiempo que permaneció el grupo control. El grupo tratado con MPA 20 mM tardó en caer 91 ± 7 s en el primer día, en el segundo día tardó 101 ± 6 s y en el tercer día 71 ± 3 s (Fig. 7A, círculos rojos). El grupo tratado con TSC 15 mM realizó en el primer día 91 ± 4 s, en el segundo 84 ± 4 s, y en el tercero 78 ± 6 s (Fig. 7A, cuadros amarillos). El grupo tratado con PLPGH 25 mM tardó 98 ± 10 s en el primer día, en el segundo tardó 76 ± 4 s y en el

tercer día 70 ± 4 s (Fig. 7A, triángulos rosas). Por el contrario, el grupo control permaneció 120 s durante los tres días de tratamiento (Fig.7A, triángulos negros).

En la prueba del registro del patrón de la zancada se realizó al tercer día de tratamiento, los grupos tratados con los inhibidores mostraron la huella del miembro ipsilateral con las falanges ligeramente juntas y una pronunciada marca del metatarso (Fig. 7B, huella color rojo), posiblemente este cambio en la posición se deba a la flacidez de los músculos de falanges. Por el contrario, tanto la huella del miembro contralateral como la huella de ambos miembros del grupo control mostró las falanges extendidas, característica de una pisada sin déficit motor (Fig. 7B, huella color negro).

En la prueba del registro de la tensión ejercida por las falanges, el valor de la amplitud registrada por cada grupo no fue diferente a la registrada por el grupo control. Por el contrario los valores de área registrados por el miembro ipsilateral de ratas tratadas con los tres inhibidores sí disminuyeron significativamente respecto al control. Los valores de la amplitud fueron de entre 0.25 a 0.44 g para los grupos tratados con los inhibidores y de 0.36 a 0.44 g para el grupo control (Fig. 7C). Los valores de área ipsilateral registrada por las ratas en tratamiento fue de entre 0.056 a 0.48 g/s y el área ipsilateral registrada por el control fue de 0.67 a 0.84 g/s (Fig. 7D). El decremento en el área registrada por el miembro ipsilateral coincide con las alteraciones motoras observadas tanto a simple vista como en la prueba del patrón de la zancada. Siendo que la amplitud mide los gramos desplazados por las falanges en el punto máximo de presión sugerimos que la fuerza máxima empleada en la tarea no fue diferente entre la de las ratas tratadas con los inhibidores y las ratas control, mientras que el tiempo que las ratas mantuvieron el bulbo de látex presionado y la fuerza por segundo durante la tarea (área), fue significativamente menor para los grupos tratados con los inhibidores.

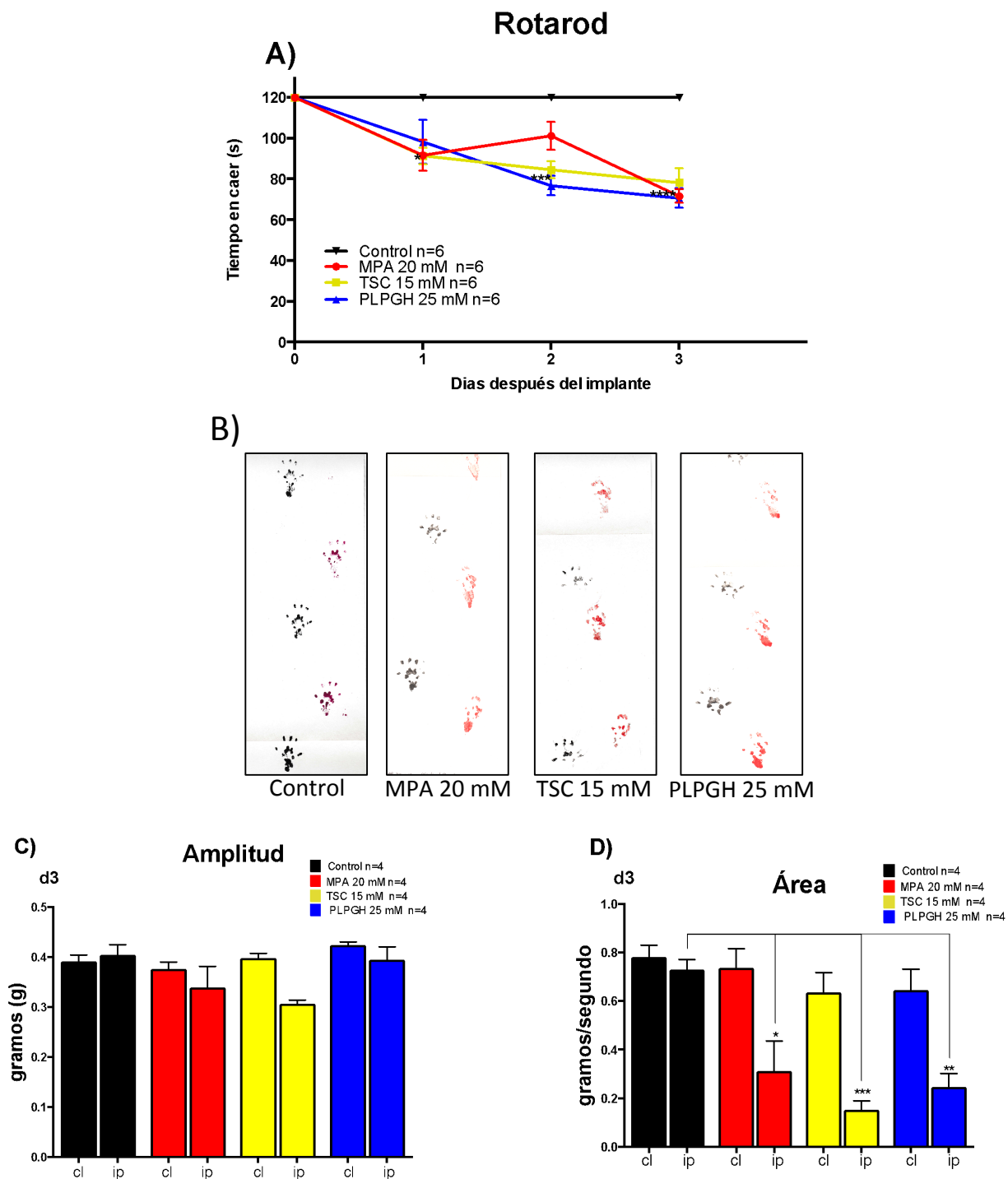


Figura 7. La administración de inhibidores de la GAD de manera crónica durante 3 días provoca alteraciones motoras. Se midió la conducta en ratas administradas continuamente durante 3 días con cada inhibidor. A) Rotarod. B) Trazos representativos del registro del patrón de la zancada. Prueba del registro de la tensión ejercida por las falanges, C) amplitud y D) área. Ip, miembro ipsilateral, cl= miembro contralateral. Los valores representan la media \pm el error estándar por grupo. ANOVA de una vía * $p < 0.05$.

La administración crónica durante 3 días provoca degeneración de MNs.

Las ratas se perfundieron al tercer día de tratamiento y la región de la médula espinal en que se infundieron los fármacos fue procesada para análisis histológico e inmunohistoquímico. Se tomaron 3 cortes por tratamiento y se marcaron con SMI-32 y GFAP. En la figura 8A,B, se muestran micrografías a un aumento de 63x de MNs localizadas en el asta ventral contralateral (a la izquierda) y en el asta ipsilateral (a la derecha) en las que se puede observar el neurofilamento en el soma de las MNs en color rojo y en color verde proyecciones de astrocitos adyacentes a estas. En las MNs del tejido control el espesor del neurofilamento provocó un marcaje homogéneo y sin huecos. Por el contrario, en las MNs del tejido administrado con los inhibidores el espesor del neurofilamento provocó un marcaje poco homogéneo en el que se observan grandes huecos, probablemente características de desregulación del citoesqueleto a causa de la degeneración. Por otro lado, en todos los casos en el lado ipsilateral los astrocitos adyacentes a las MNs son más grandes que los astrocitos adyacentes a las MNs del lado contralateral de cada grupo. Estas características son propias de una glía reactiva, para estudiar este evento se tomaron micrografías a menor aumento que nos permitieran cuantificar la cantidad de astrocitos presentes en cada asta ventral. Los resultados se muestran en la figura 9. En azul se marcaron núcleos celulares utilizando DAPI.

En los cortes que se procesaron para tinción con violeta de cresilo (no mostradas) se contaron el número de MNs en cada asta ventral, a un aumento de 10x, como se describió en los métodos. La cuantificación se muestra en la figura 8C. Se puede observar que el número de MNs en el lado ipsilateral de cada grupo administrado con los inhibidores fue significativamente menor al número de MNs del mismo lado del grupo control. El promedio de MNs contadas en cada grupo fue el siguiente: control MNs 20 ± 0.2 en el lado contralateral y 19 ± 0.4 en el lado ipsilateral fue de MNs, en el grupo tratado con MPA 20 mM fue de 16 ± 0.4 en el lado contralateral y de 10 ± 0.8 , en el grupo administrado con TSC 15 mM fue de 14 ± 0.4 en el contralateral y de 6 ± 0.5 en el ipsilateral, en el grupo con PLPGH 25 mM fue de 16 ± 0.5 en el contralateral y de 10 ± 0.1 en el ipsilateral. Es decir, en el lado contralateral hubo una disminución de alrededor del 25% y en el ipsilateral fue de aproximadamente el 60%. No hubo una diferencia significativa entre los grupo tratados con cada inhibidor.

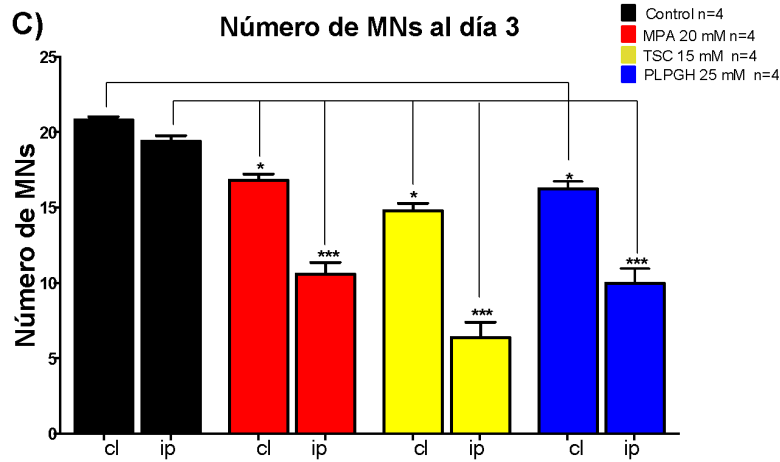
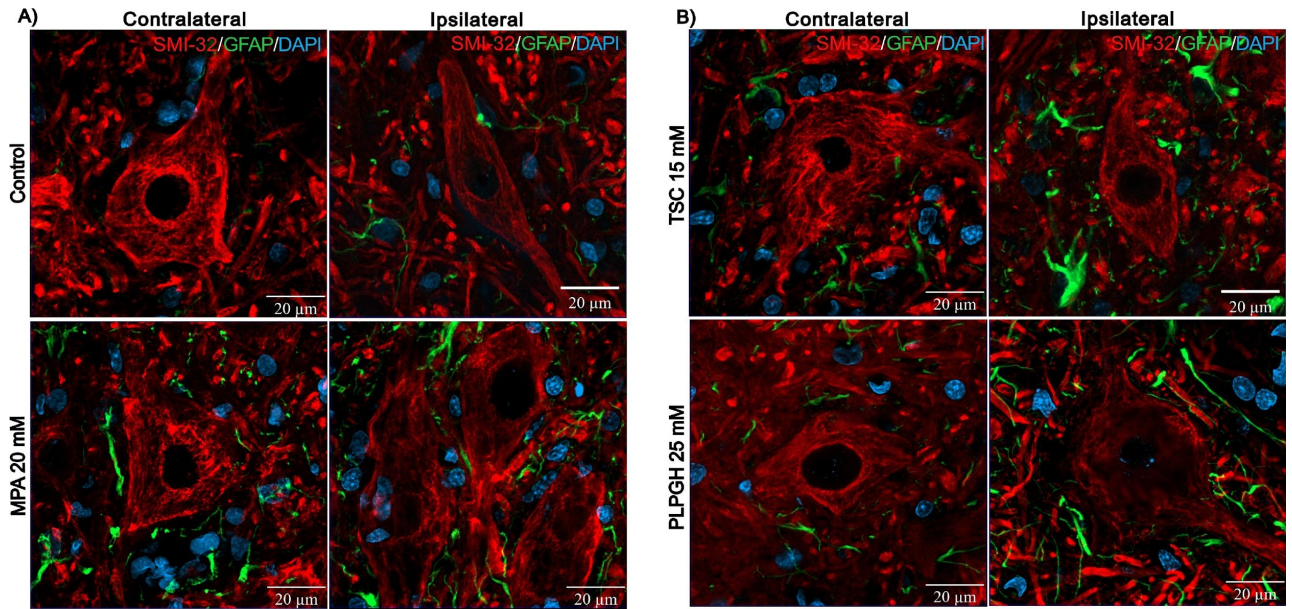
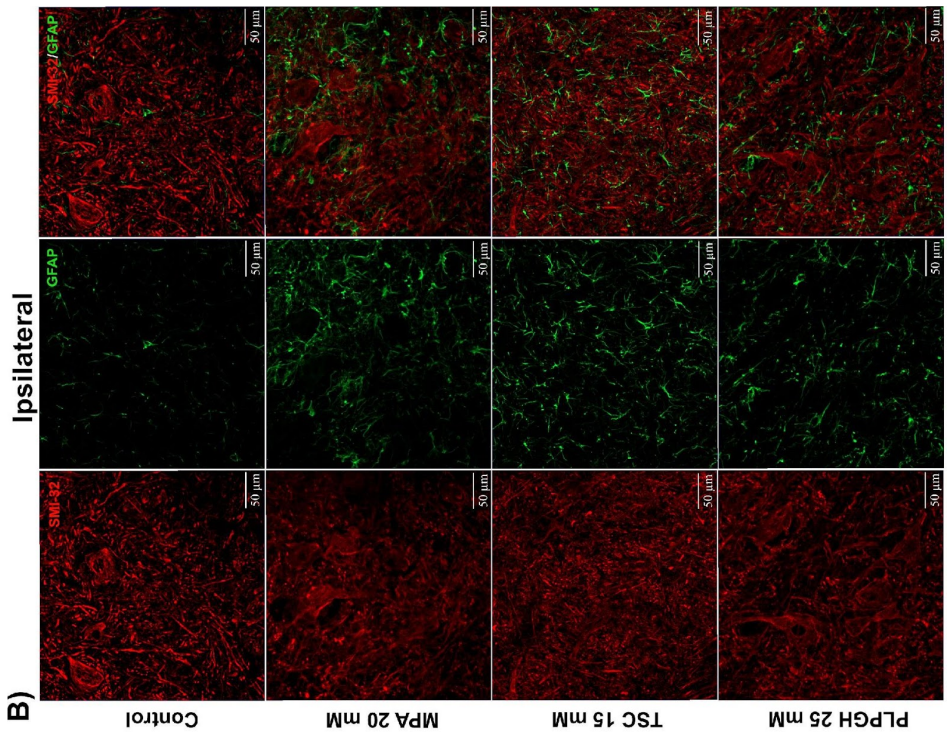
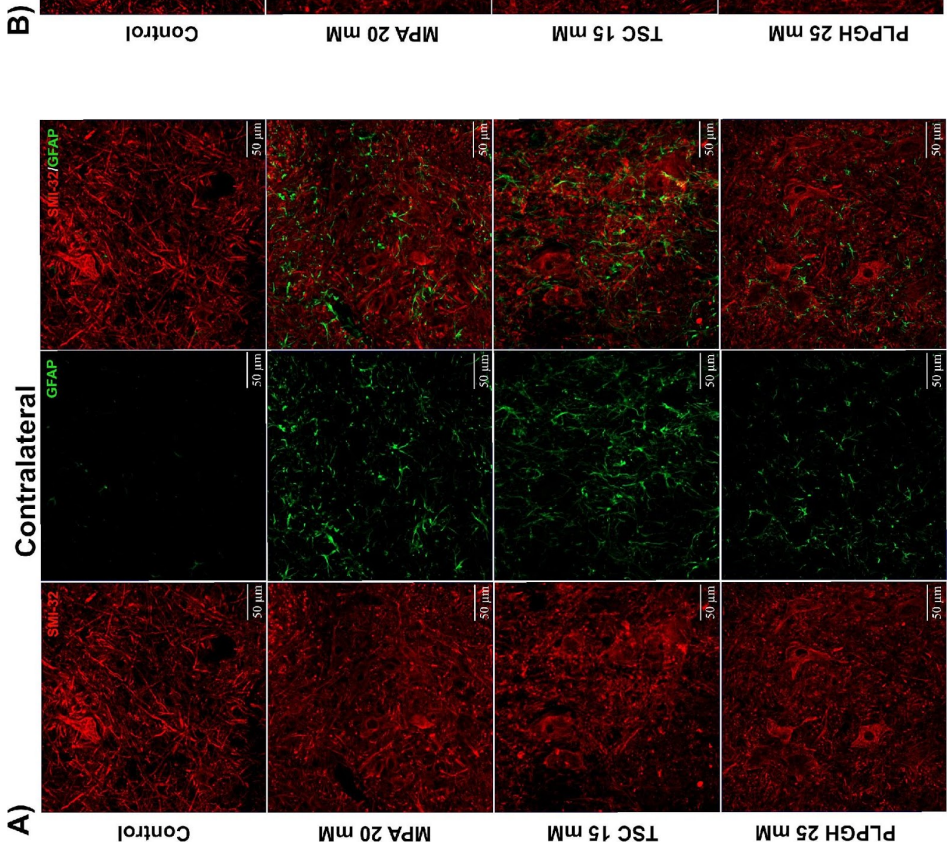


Figura 8. La administración crónica durante 3 días provoca degeneración de MNs. A,B) Micrografías de cortes de la médula espinal del sitio de administración tomadas a un aumento de 63x. C) Cuantificación del número de MNs de la región de administración, en los cortes teñidos con violeta de cresilo., Ip, asta ipsilateral, cl, asta contralateral. Los valores representan la media \pm el error estándar por grupo. ANOVA de una vía * $p < 0.05$. C). $n=4$ en todos los casos.

La administración crónica durante 3 días provoca gliosis reactiva.

Se tomaron tres cortes por rata del sitio de la médula espinal en donde se administró cada inhibidor o vehículo, se tomó una micrografía de 10 planos de cada asta ventral. Se cuantificó el área correspondiente a astrocitos usando el programa Zeiss LSM 800. En la figura 9 se muestran las micrografías representativas de los cortes transversales a un aumento de 20x, marcados con SMI-32 para identificar neurofilamento y con GFAP para identificar astrocitos. En el lado ipsilateral de los grupos administrados con MPA 20 mM o TSC 15 mM se observa un aumento en la marca de GFAP significativamente mayor al determinado en el grupo control, este aumento se debe a un incremento en el tamaño y el número de ramificaciones de los astrocitos. Estas características morfológicas son propias de un proceso de astrogliosis reactiva. Interesantemente, a pesar de que en el tejido tratado con PLPGH el número de MNs del lado ipsilateral disminuyó significativamente respecto al control, el incremento en la marca de GFAP no alcanzó a ser significativa. La glía en el lado ipsilateral de las ratas tratadas con MPA 20 mM o TSC 15 mM fue 12 veces la cuantificada en el mismo lado en el grupo control. Mientras que la cuantificada en el lado ipsilateral del grupo tratado con PLPGH aumentó solo 6 veces respecto al control. El aumento en la marca de GFAP en el lado contralateral no llegó a ser significativa (Fig. 9C).



C) Área marcada con GFAP al día 3

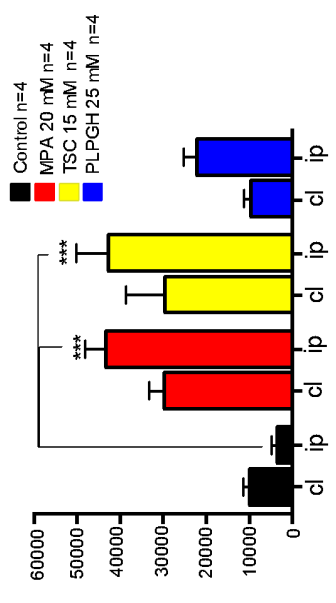


Figura 9. La administración crónica durante 3 días provoca gliosis reactiva. A,B) Micrografías del asta ventral ipsilateral y contralateral a un aumento de 20x. C) Cuantificación del área marcada con GFAP. Cl, asta contralateral, ip, asta ipsilateral. Los valores representan la media ± el error estándar por grupo. ANOVA de una vía *p <0.05.

La administración crónica durante 3 días provoca un decremento en la actividad de la GAD.

Un grupo de ratas distinto, que fue administrado de la misma manera durante 3 días, se sacrificó al tercer día de tratamiento para realizar la medición de la actividad de la GAD, en presencia y en ausencia de su cofactor, PLP, como se describió en los métodos. La actividad medida en el lado ipsilateral y contralateral del tejido de las ratas tratadas con cada inhibidor fue significativamente menor a la actividad medida en ambos lados de la médula espinal de las ratas control (Fig. 10). La actividad se reportó en pmoles de CO₂ producidas en 20 min por miligramo de proteína. Los valores medidos en el lado ipsilateral en ausencia de PLP por cada grupo fueron los siguientes: control 787 ± 164, MPA 205 ± 67, TSC 374 ± 127 y PLPGH 322 ± 79. La actividad en el lado contralateral en ausencia de la coenzima por cada grupo fue: control 743 ± 107, MPA 207 ± 55, TSC 275 ± 74 y PLPGH 255 ± 58. Mientras que la actividad en presencia de PLP para cada grupo en el lado ipsilateral fue: control 785 ± 106, MPA 298 ± 101, TSC 326 ± 88 y PLPGH 371 ± 80. Y la actividad medida en el lado contralateral fue de: control 736 ± 137, MPA 331 ± 73, TSC 307 ± 56 y PLPGH 371 ± 99. Así, la actividad de la GAD medida en el tejido de las ratas tratadas con los inhibidores disminuyó de entre 2 a 4 veces respecto a la actividad medida en el tejido del grupo control. Siendo el grupo con MPA el que presentó una mayor disminución. El grupo MPA ip -PLP disminuyó 4 veces, el grupo TSC ip -PLP disminuyó 2.6 veces, el grupo PLPGH ip -PLP disminuyó 2.6 veces. El grupo MPA cl-PLP disminuyó 3.5 veces, el TSC cl -PLP disminuyó 2.6 veces, el PLPGH cl -PLP disminuyó 2.9 veces. El MPA ip+PLP disminuyó 2.6 veces, el TSC ip+PLP disminuyó 2.4 veces, el PLPGH ip +PLP disminuyó 2 veces. El MPA cl +PLP disminuyó 2.2 veces, el TSC cl +PLP disminuyó 2.39 veces, el PLPGH cl +PLP disminuyó 1.9 veces.

Interesantemente, el nivel en que se inhibió la actividad de la GAD fue muy similar en ambas astas ventrales, sin embargo las alteraciones conductuales y celulares fueron mayores y significativas en el lado ipsilateral a la administración. Diferente a lo que se esperaba, es importante resaltar que no hubo un incremento significativo en la actividad de la enzima cuando se agregó PLP al medio, ni en el grupo control ni en los grupos tratados con los inhibidores.

Actividad de la GAD al día 3

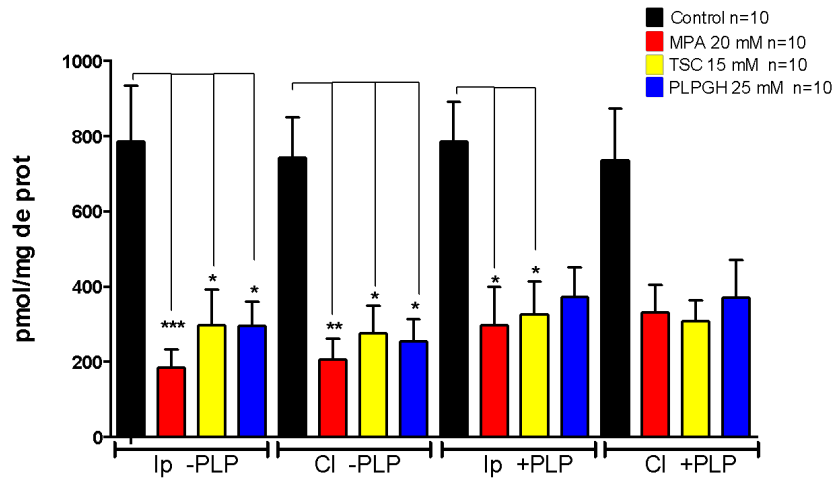


Figura 10. La administración crónica durante 3 días provoca un decremento en la actividad de la GAD en ambas astas ventrales. Ip= asta ipsilateral, cl= asta contralateral. Los valores representan la media \pm el error estándar por grupo. ANOVA de una vía *p <0.05.

3.- Administración crónica de inhibidores de la glutamato descarboxilasa en la médula espinal durante 10 días

La administración de inhibidores de la GAD de manera crónica durante 10 días produce déficit motor en los músculos distales de los cuartos traseros.

Después de estudiar los efectos de la administración de los inhibidores durante 3 días realizamos otros grupos de ratas a las cuales se les administraron los inhibidores durante 10 días, con el objetivo de observar si el déficit motor y las alteraciones celulares se incrementaban al aumentar el tiempo de exposición a los inhibidores. Además se implementaron dos concentraciones distintas de MPA, 3 y 10 mM para ver si los efectos observados dependían de la dosis. Estos grupos de ratas presentaron las alteraciones motoras de manera muy similar a las reportadas en los grupos tratados por 3 días.

La prueba de rotarod se realizó diariamente durante todo el tratamiento, el tiempo que las ratas tardaron en caer del cilindro disminuyó desde el primer día de administración (24 horas después del implante de la mino bomba) y se mantuvo aproximadamente constante hasta el décimo día, los promedios mínimo y máximo realizados en el rotarod por cada grupo fueron los siguientes: MPA 3 mM de 90 a 120 s (Fig.1A, círculos rosas),

MPA 10 mM de 63 a 117 s (Fig. 11A, cuadrados verdes), MPA 20 mM de 61 a 118 s (Fig. 11A, rombos rojos), TSC de 92 a 117 s (Fig. 11A, rombos amarillos), PLPGH de 69 a 120 s (Fig. 11A, círculos azules), por el contrario, el grupo control permaneció 120 s durante todo el tratamiento (Fig. 11A, triángulos negros). A partir del quinto día el tiempo en que tardaron en caer las ratas administradas con MPA 10, 20 mM, y PLPGH 25 mM fue significativamente menor al tiempo que tardó en caer el grupo control.

En cuanto a la prueba de la escalera, en el tiempo que tardaron en cruzar la rejilla y el número de errores no encontramos diferencias significativas comparadas con el grupo control, sin embargo, en todos los grupos administrados con los inhibidores se observó una tendencia a aumentar tanto el tiempo como el número de fallas (Fig. 11 B, C).

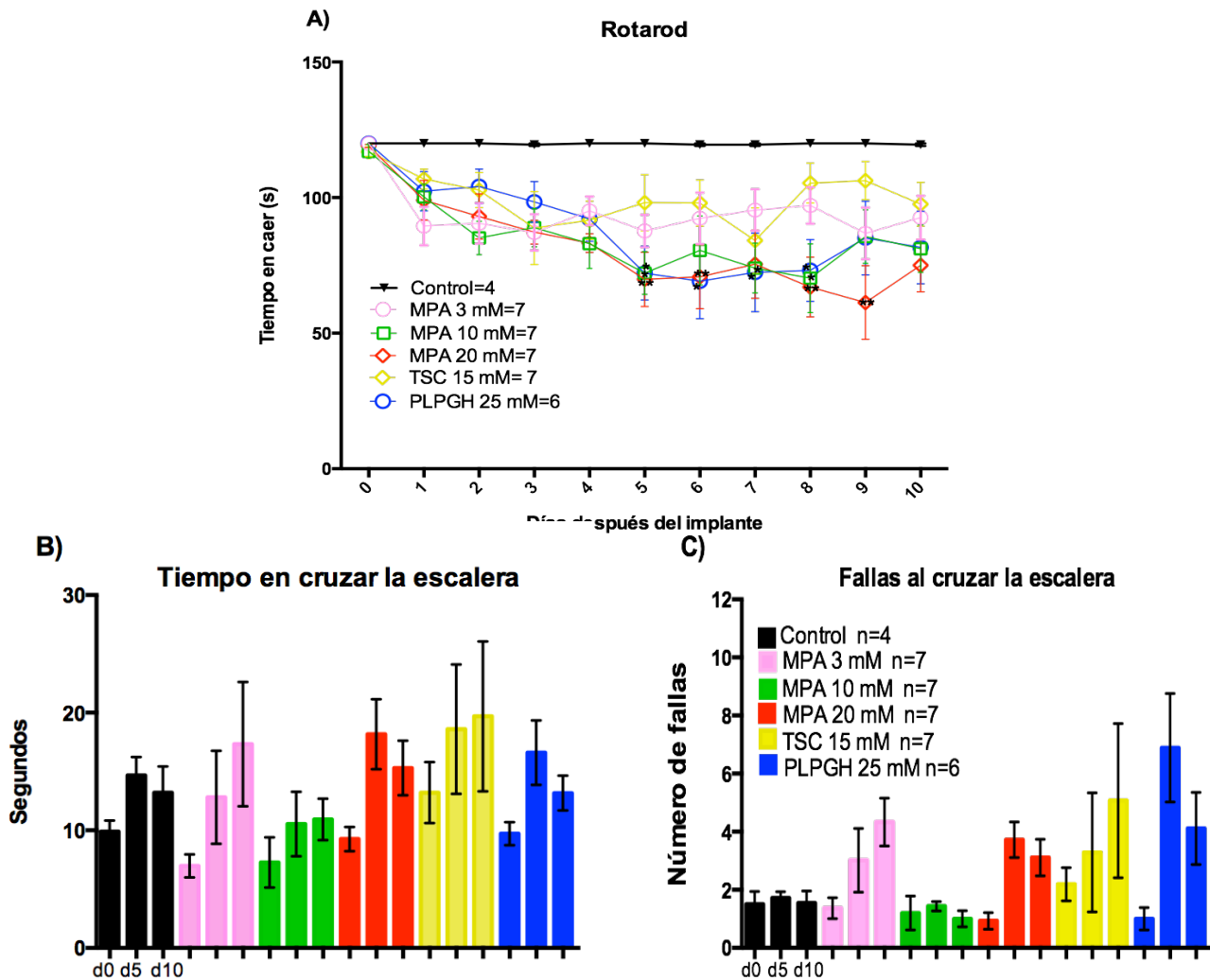


Figura 11. La administración de inhibidores de la GAD de manera crónica durante 10 días provoca alteraciones motoras. A) El rotarod se realizó diariamente durante los 10 días de tratamiento. B) El

tiempo y C) fallas al cruzar la escalera evaluado antes, al quinto y al décimo día de tratamiento. Los valores representan la media \pm el error estándar. ANOVA de una vía *p <0.01.

La prueba del patrón de la zancada se realizó en el momento en que las ratas presentaron mioclonías, así como al quinto y al décimo día de tratamiento. Durante las mioclonías, además del movimiento involuntario, las falanges de la pata ipsilateral se mostraron espásticas y al caminar se mantuvieron en puño. Debido a esto, en el patrón de la zancada se observaron manchas en lugar de la marca de las falanges extendidas. En la figura 12A se muestran los registros representativos, los medios círculos de color amarillo señalan algunas huellas correspondientes a la pata ipsilateral en puño, este evento no persistió durante el resto del tratamiento, por ello lo denominamos como alteración episódica. En el registro al quinto y décimo día, en la huella ipsilateral de las ratas administradas con los inhibidores observamos las siguientes alteraciones: las falanges ipsilaterales ligeramente juntas (medios círculos verdes), la marca del metatarso más pronunciada que en las huellas control (líneas azules), un trazo continuo entre las falanges debido al arrastre del miembro durante la marcha (medios círculos azules) y en algunos casos la distancia entre cada huella ipsilateral fue menor comparada con la distancia en la marcha de una rata sana (línea verde) (Fig. 12B,C), estas alteraciones fueron denominadas como permanentes. Los registros representativos no corresponden a la misma rata a lo largo de los días del tratamiento. Es importante resaltar que la presencia de mioclonías fue independiente de la característica flacidez observada en la pata ipsilateral.

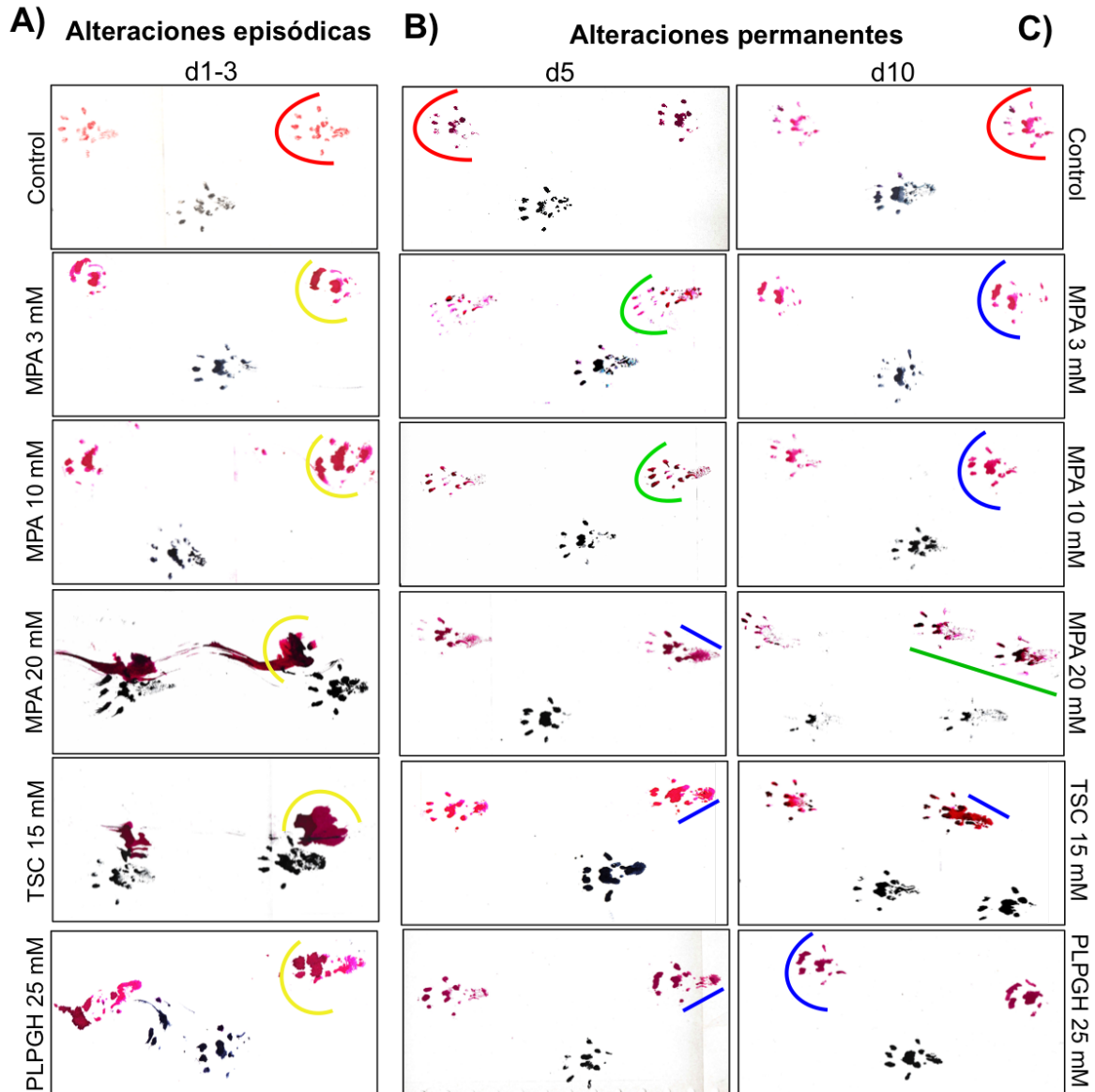


Figura 12. Alteraciones en la zancada de las ratas administradas con los inhibidores de la GAD. A) Registros representativos del registro del patrón de la zancada realizados en el momento de las mioclonías (d1, d2 o d3 de tratamiento), la espasticidad durante el episodio provocó que la pisada de la pata ipsilateral tuviera las falanges encogidas a manera de puño (medios círculos amarillos). B) registros representativos evaluados al quinto día y C) al décimo de tratamiento que muestran alteraciones motoras permanentes como: falanges juntas (medios círculos verdes), la marca pronunciada del metatarso (líneas azules), trazo continuo entre las falanges debido al arrastre de la pata durante la marcha (medios círculos azules) y disminución de la distancia entre cada huella ipsilateral (línea verde). A-C) Los medios círculos rojos corresponden a la huella ipsilateral con las falanges extendidas, característica de una pisada sana.

La prueba RTF se realizó al quinto y al décimo día de tratamiento, en la figura 13A, se muestra un trazo representativo de la digitalización del registro obtenido por una rata control y el registro obtenido por una rata tratada con MPA 20 mM al décimo día para ejemplificar el cambio en el tamaño tanto en la amplitud como en el área registrada por los grupos tratados con los inhibidores. La amplitud promedio registrada antes de la cirugía (Fig. 13B) por todos los grupos incluyendo el control fue de entre 0.38 y 0.41 g. La amplitud promedio de la pata ipsilateral registrada al quinto día de tratamiento (Fig. 13C) disminuyó en los grupos administrados con MPA 20 mM, TSC 15 mM y PLPGH 25 mM comparado con el control. Los valores registrados en la pata contralateral no fueron significativamente menores. La amplitud registrada al décimo día de tratamiento fue significativamente menor en ambos cuartos traseros (Fig. 13D).

El área promedio registrada antes de la cirugía (Fig. 13E) para todos los grupos incluyendo al control fue de entre 0.83 a 1.22 g/s. Al quinto día de tratamiento el área promedio registrada por la pata ipsilateral de los grupos administrados con MPA 20 mM, TSC 15 mM y PLPGH 25 mM fue significativamente menor, en el décimo día, los registros de ambos miembros fueron significativamente menores (Fig. 13F). Respecto a los grupos administrados con MPA3 y 10 mM, solo el área registrada por la pata ipsilateral fue significativamente menor tanto en el quinto como en el décimo día, mientras que el registro de la pata contralateral no disminuyó en ningún caso.

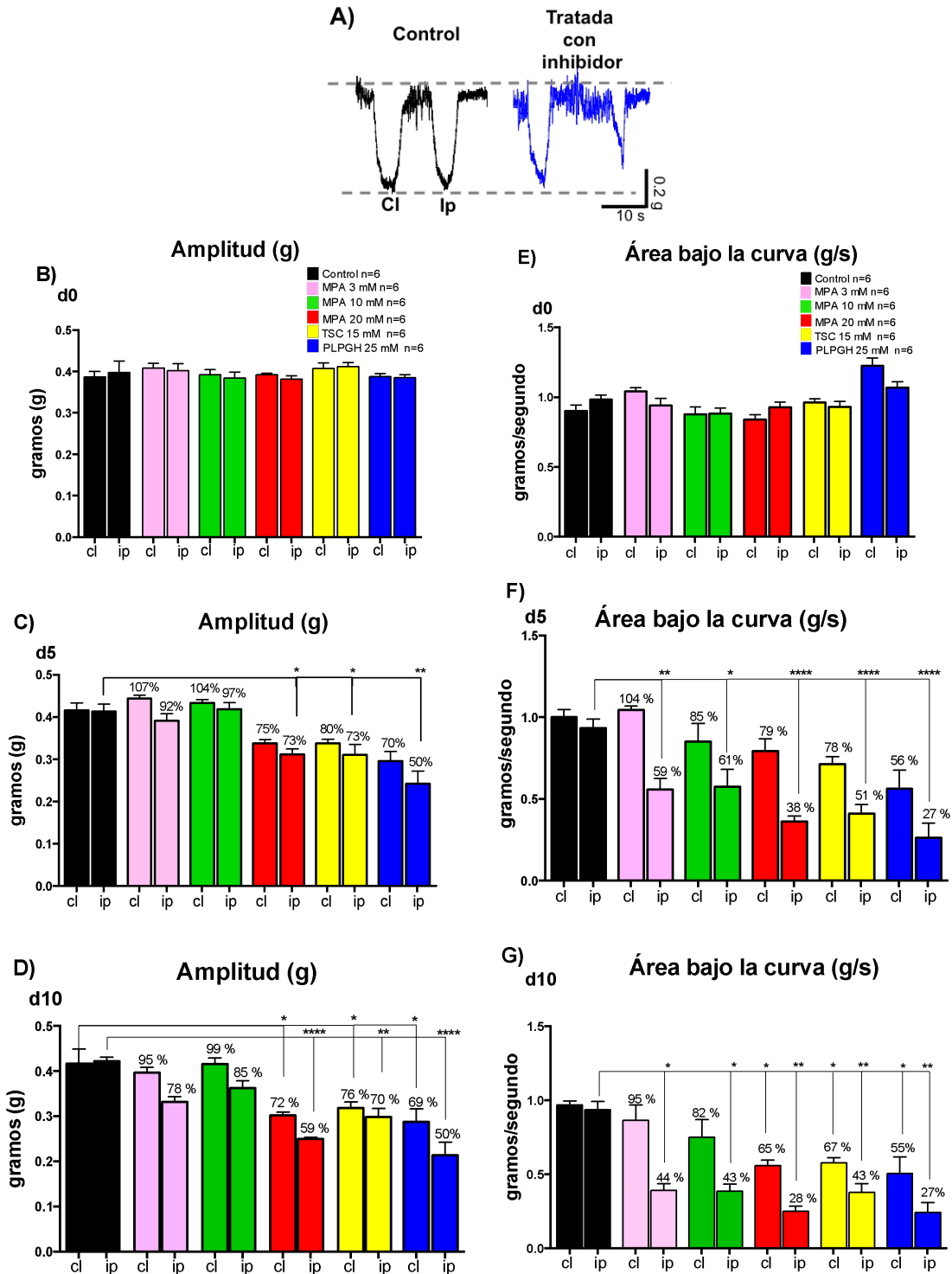


Figura 13. Alteraciones en la tensión ejercida por los músculos de las falanges de ratas administradas crónicamente con inhibidores de la GAD durante 10 días. A) Digitalización representativa del grupo control y el grupo administrado con MPA 20 mM al décimo día de tratamiento. B) Amplitud promedio antes de la cirugía, C) al quinto y D) al décimo día de tratamiento. E) Área promedio antes de la cirugía, F) al quinto y G) al décimo día de tratamiento. Ip, miembro ipsilateral, cl, miembro contralateral. Los valores representan la media \pm el error estándar. ANOVA de una vía * $p < 0.05$.

La administración durante 10 días produce degeneración de MNs espinales

Las ratas administradas con los inhibidores durante diez días se perfundieron al término del tratamiento y la región de la médula espinal en que se infundieron los fármacos fue procesada para análisis histológico e inmunohistoquímico. En la figura 14A se muestran las micrografías representativas de los cortes transversales del sitio de administración a un aumento de 10x, en el panel derecho se muestra el asta ventral ipsilateral y en el panel izquierdo el asta ventral contralateral. El número promedio de MNs contadas en el sitio de infusión de cada grupo fue el siguiente: control 19 ± 1 MNs en el lado contralateral y en el lado ipsilateral fue de 18 ± 0.8 MNs, en el grupo tratado con MPA 3 mM en el contralateral fue de 17 ± 0.9 MNs y en el ipsilateral de 11 ± 2 MNs, en el grupo tratado con MPA 10 mM en el contralateral fue de 16 ± 1 MNs y en el ipsilateral de 12 ± 1 MNs, en el grupo tratado con MPA 20 mM en el contralateral fue de 17 ± 0.4 MNs y en el ipsilateral de 10 ± 1 MNs, en el grupo tratado con TSC en el contralateral fue de 15 ± 1 MNs y en el ipsilateral de 10 ± 0.2 MNs, en el grupo tratado con PLPGH en el contralateral fue de 16 ± 0.5 MNs y en el ipsilateral de 14 ± 0.5 MNs (Fig. 14B). En resumen, en el lado ipsilateral el número de MNs de todos los grupos administrados con inhibidor disminuyó significativamente respecto a las MNs en el tejido control, el porcentaje de disminución fue de entre 50% a 35% dependiendo del inhibidor, en el lado contralateral de todos los grupos administrados con inhibidores hubo un decremento de alrededor del 10 %, sin embargo, sólo fue significativo en las ratas administradas con MPA 20 mM y TSC 15 mM. En la figura 14C se muestran las micrografías representativas del sitio de administración a un aumento de 63x, en rojo se marcó SMI-32 para identificar neurofilamentos y en verde se marcó GFAP para identificar astrocitos. Similar a lo observado al tercer día de tratamiento, se espacian en el neurofilamento tanto del soma como de algunos axones de las MNs. Así como un incremento en la marca de GFAP en el lado ipsilateral de los tejidos de ratas tratadas con TSC y las tres concentraciones de MPA. El análisis del aumento en la marca de GFAP se aborda en el experimento de la figura 15.

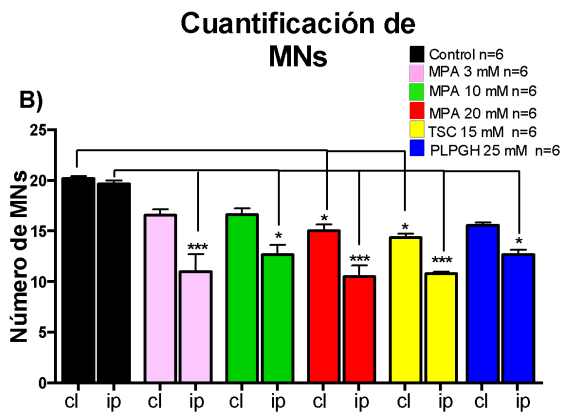
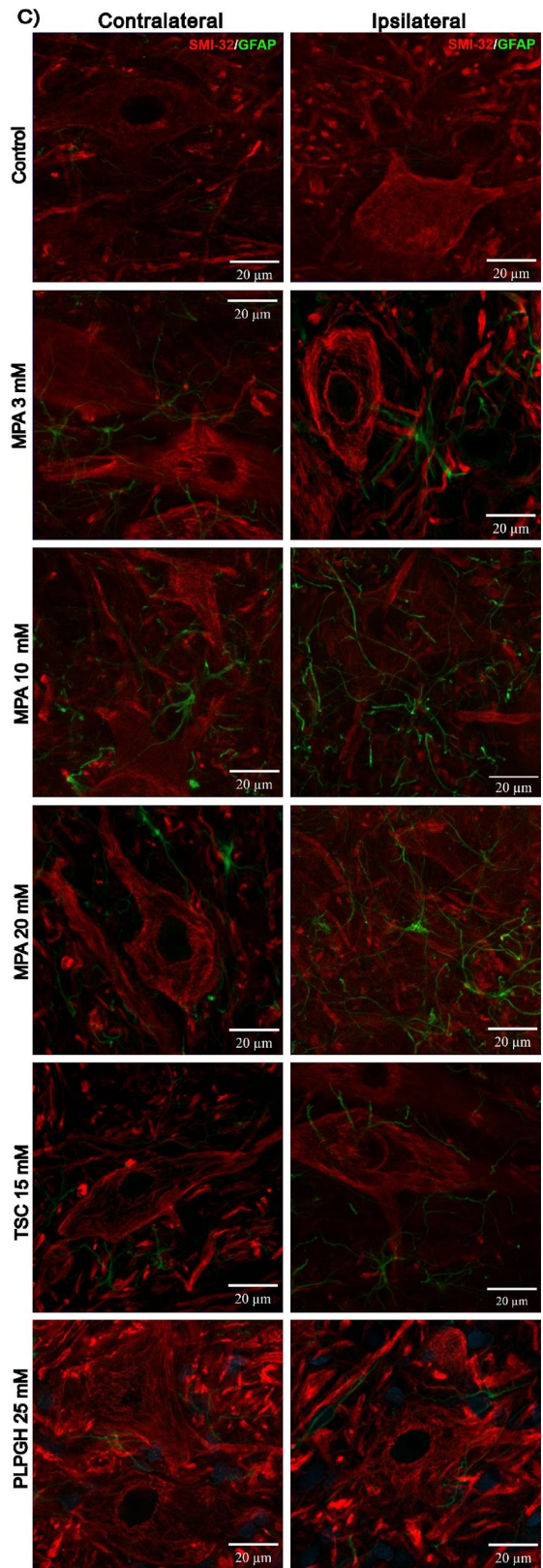
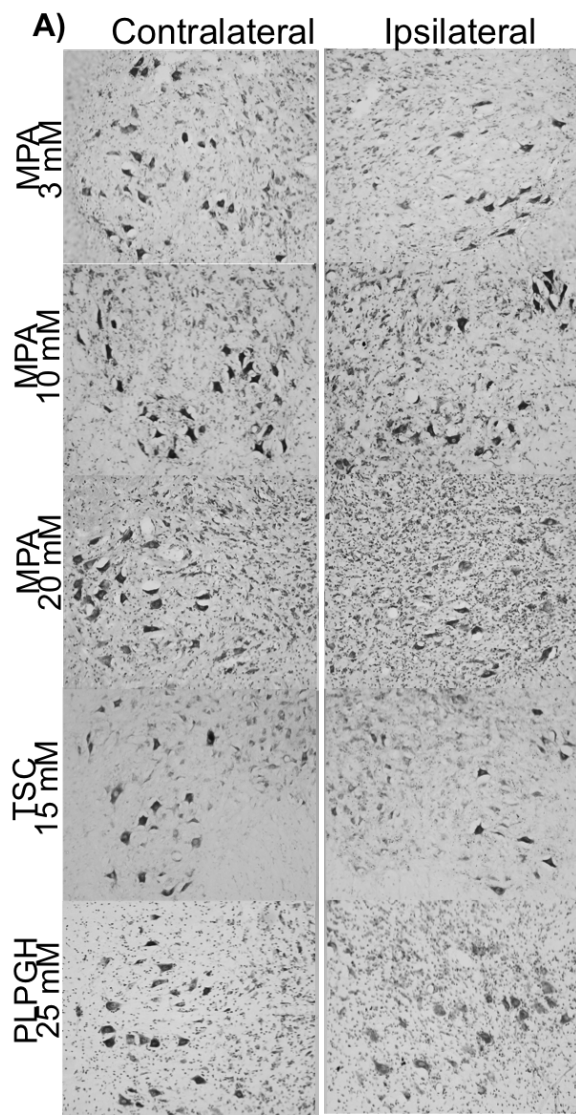


Figura 14. Degeneración de MNs espinales causada por la administración durante 10 días de inhibidores de la GAD. A) Micrografías a un aumento de 10x de la región ventral del sitio de administración teñidas con violeta de cresilo. B) Cuantificación del número de MNs presentes en los cortes teñidos con violeta de cresilo. Cl, asta contralateral, ip, asta ipsilateral. Los valores representan la media \pm el error estándar por grupo. ANOVA de una vía * $p < 0.05$. C) Micrografías de cortes de la médula espinal del sitio de administración tomadas a un aumento de 63x. $n=6$ en todos los casos.

La administración crónica durante 10 días de los inhibidores de la GAD en la médula espinal de rata produce gliosis reactiva.

En cuanto a la inmunohistoquímica, se marcaron tres cortes por rata del sitio en que se administró cada inhibidor o vehículo, se tomó una micrografía de 10 planos de cada asta ventral. Se cuantificó el área correspondiente a astrocitos usando el programa Zeiss LSM 800. En la figura 15 se muestran las micrografías representativas de los cortes transversales a un aumento de 20x, a la derecha se muestra el asta ventral ipsilateral y a la izquierda el asta ventral contralateral. En el lado ipsilateral de los grupos administrados con inhibidor se observa un aumento en la superficie marcada con GFAP que corresponde a un aumento en el tamaño y el número de ramificaciones de los astrocitos, estas características morfológicas son propias de un proceso de astrogliosis reactiva. La astrogliosis reactiva observada en las micrografías de los grupos tratados con MPA parecen ser dependiente de la dosis, el lado ipsilateral administrado con MPA10 y 20 mM fueron significativamente mayores al cuantificado en el control. La marca de GFAP tuvo un aumento similar entre las micrografías de los grupos tratados con TSC 15 mM y PLPGH 25 mM, sin embargo, este incremento no llegó a ser significativamente diferente respecto al control. En el asta contralateral la marca de astrocitos incrementó en el tejido de las ratas tratadas con las tres concentraciones de MPA, sin embargo, este aumento sólo fue significativo en el tejido de las ratas tratadas con MPA 20 mM.

La superficie marcada con GFAP fue significativamente mayor en el tejido de ratas tratadas con MPA y TSC en ambos tiempos, 3 y 10 días. Sin embargo la superficie marcada en el décimo día fue menor a la superficie marcada en el tercer día. Esto se interpreta como que la activación de la glía tiene un pico de aumento en etapas iniciales del tratamiento y disminuye ligeramente en etapas finales del tratamiento. Poniendo estos resultados en números, en el décimo día la superficie de la glía en el lado ipsilateral de las ratas tratadas con MPA 20 mM fue 7 veces el cuantificado en el control, mientras al tercer día fue de 12 veces respecto al control. En el tejido tratado con TSC la superficie de la glía en el lado ipsilateral al décimo día fue de sólo 3 veces la cuantificada en el control y al tercer día fue de 12 veces la cuantificada en el control. La superficie de la glía en el lado ipsilateral de las ratas tratadas con PLPGH al décimo día fue de 3.7 veces respecto al control y al tercer día fue de 6 veces respecto al control. En este caso, pese a que siguió el mismo patrón el incremento en la superficie de la glía no llegó a ser significativo en ningún tiempo.

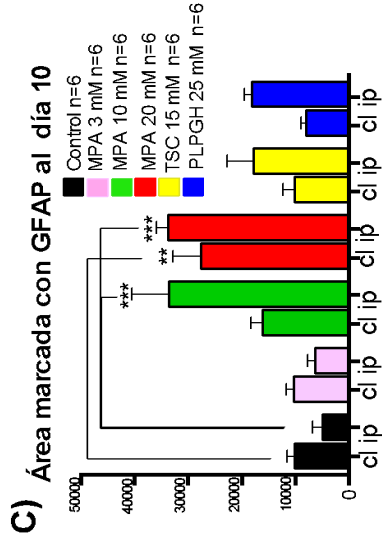
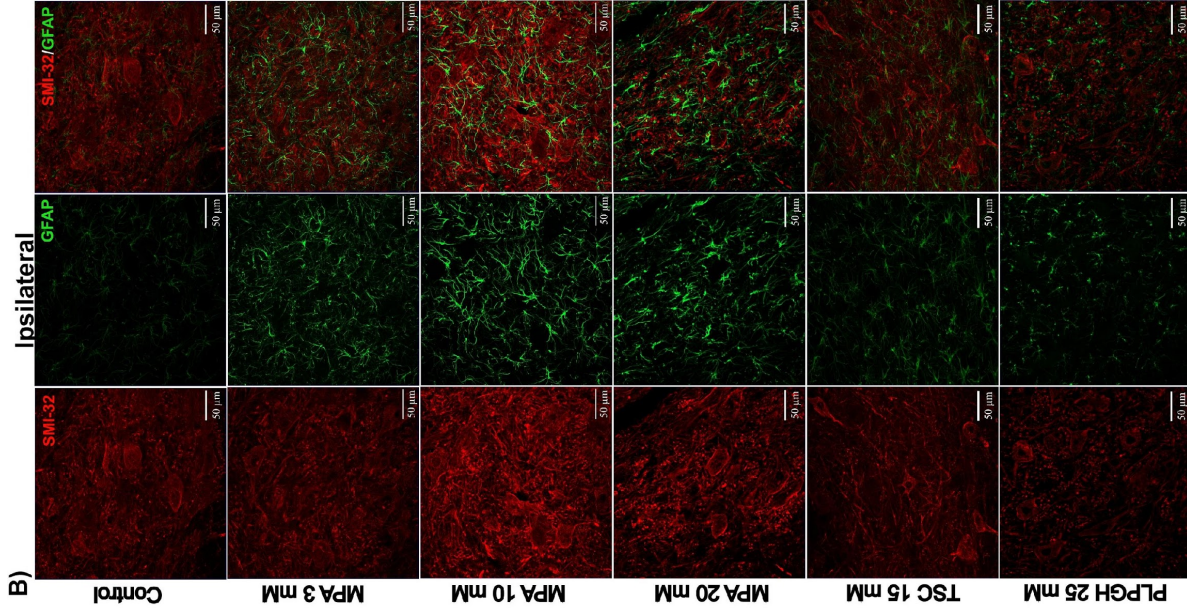
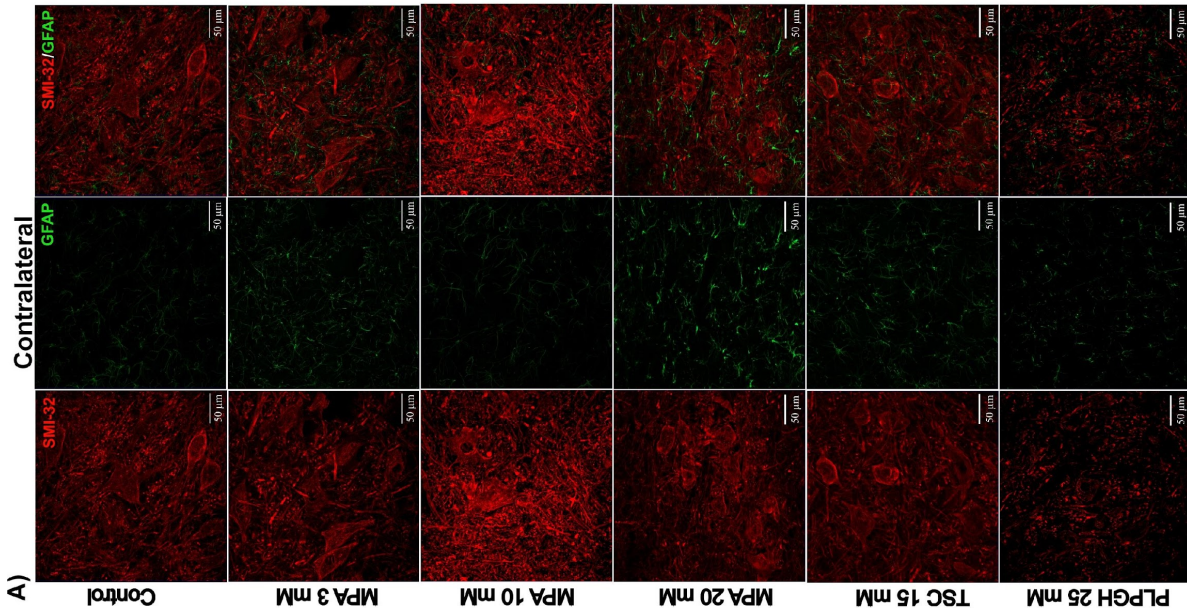


Figura 15. La administración crónica durante 10 días de los inhibidores de la GAD en la médula espinal de rata produce gliosis reactiva. A,B) micrografías representativas del asta ventral ipsilateral y contralateral a un aumento de 20x. C) Cuantificación del área marcada con GFAP. Los valores representan la media \pm el error estándar. n=6 en todos los casos. ANOVA de una vía *p <0.05.

La administración crónica durante 10 días de los inhibidores de la GAD en la médula espinal de rata no altera la actividad de la enzima.

Un grupo de ratas distinto, que fue administrado de la misma manera durante 10 días, al final del tratamiento para realizar la medición de la actividad de la GAD, en presencia y en ausencia de su cofactor, PLP. La actividad medida en el lado ipsilateral y contralateral del tejido de las ratas tratadas con cada inhibidor no fue significativamente diferente a la actividad medida en el tejido control (Fig. 16). Los valores medidos en todos los grupos incluido el control fueron entre 402 y 714 pmoles en ambas astas ventrales. Ningún valor fue significativamente diferente al control. Al décimo día el valor disminuyó 1.5 veces el control, por el contrario, la actividad medida al tercer día de tratamiento que disminuyó significativamente fue de al menos 2.6 veces menor al valor control. Similar a lo determinado al tercer día de tratamiento, en el décimo día la actividad de la GAD es muy similar en ambas astas ventrales y no incrementa cuando se agrega PLP al medio. Los resultados sugieren que a pesar de la continua administración de los inhibidores, al décimo día la actividad de la GAD se restablece a valores muy similares al control.

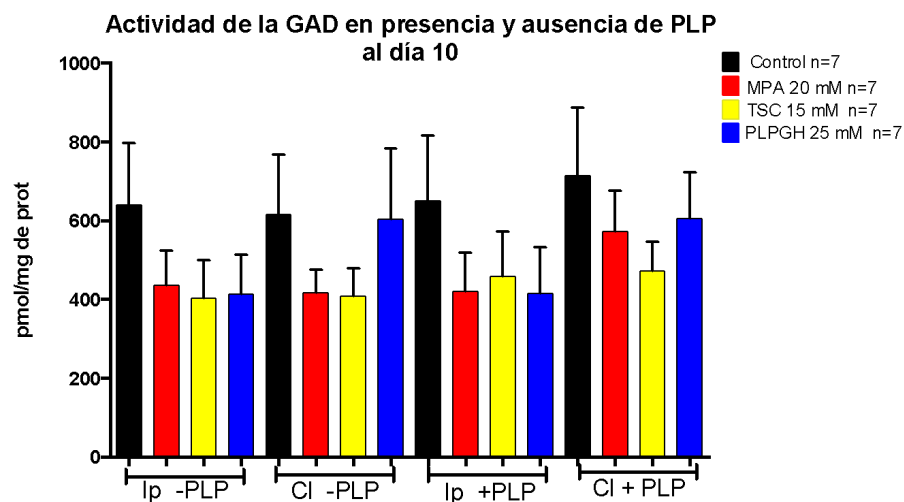


Figura 16. *La administración crónica durante 10 días de los inhibidores de la GAD en la médula espinal de rata no altera la actividad de la GAD.* A) Actividad de la GAD medida en el asta ventral ipsilateral y contralateral en ausencia de la coenzima (Ip-PLP, CI-PLP) y en presencia de la coenzima (Ip+PLP, CI+PLP). Los valores representan la media \pm el error estándar. ANOVA de una vía * $p < 0.05$.

VIII.- Discusión

La inhibición crónica, pero no la inhibición aguda de la actividad de la GAD, causa alteraciones motoras.

El bloqueo agudo de la actividad de la GAD no causó alteraciones motoras. Por el contrario, la inhibición crónica en la médula espinal de rata sí provocó déficit motor en los músculos distales de los cuartos traseros, caracterizado como flacidez en las falanges y el metatarso. De manera similar, la administración crónica pero no la aguda de bicuculina (un bloqueador de receptores GABA tipo A), en la médula espinal de rata, provocó alteraciones motoras similares a las reportadas en nuestro estudio (Ramirez-Jarquín y Tapia, 2017). Debido a estos resultados concluimos que se requiere de un bloqueo prolongado para afectar la funcionalidad de los circuitos inhibidores GABAérgicos, ya sea afectando a la actividad de la enzima o bloqueando la actividad del receptor postsináptico. Probablemente tanto la inhibición de la enzima como el bloqueo del receptor de manera aguda no produjo cambios motores debido a que la administración se realizó bajo anestesia. El anestésico isoflurano, empleado en ambos trabajos, incrementa las corrientes de cloro activadas por el receptor de GABA tipo A (Harrison et al., 1993). Apoyando esta idea, la administración aguda en rata despierta (sin utilizar anestesia) de inhibidores de la GAD en el hipocampo sí produjo alteraciones motoras (Salazar y Tapia, 2015).

Por otro lado, se observó flacidez muscular en las falanges desde el inicio del tratamiento crónico y hasta el final del tratamiento (décimo día). La flacidez muscular se debe a que el músculo deja de ser activado. Esta disminución en la actividad del músculo puede ocurrir en consecuencia a un decremento del número de placas motoras (Torii et al., 2010), o en consecuencia de la degeneración del axón (Robinson, 2000).

A pesar de que la administración se realizó entre los segmentos L4-L5, donde se localizan MNs que inervan tanto a músculos distales como proximales, el déficit motor se observó principalmente en los músculos más distales de los cuartos traseros, es decir, los músculos que recubren a las falanges y al metatarso. Interesantemente estos músculos están compuestos principalmente por fibras musculares tipo FR y FF, mientras que los músculos proximales están compuestos mayoritariamente por fibras tipo S (Bobinac et al., 2000). En modelos transgénicos de ELA se ha determinado que las fibras musculares tipo

S son más resistentes a la denervación en comparación con las fibras tipo FR, FF (Bobinac et al., 2000; Hegedus et al., 2008; Tallon et al., 2016). Cada tipo de fibra presenta diversas características que podrían otorgarle vulnerabilidad o resistencia a la excitotoxicidad, mecanismo que se ha propuesto como evento causal de la ELA. Las fibras tipo S tienen una baja tasa de activación debido a que su proteína contráctil tipo MyHC-I tiene una baja actividad. Además, su periodo de hiperpolarización también es más prolongado, es decir, el tiempo entre cada despolarización es mayor. Por el contrario, las fibras tipo FF y FR, tienen una alta tasa de activación debido a que sus proteínas contráctiles MyHC-IIa y MyHC-IIb tienen una mayor actividad, además de que sus periodos de hiperpolarización son cortos (de Carvalho y Swash, 2016; Lopez, 2003). Así, ante un evento que ocasione sobreactivación, como el decremento en la función de las sinapsis inhibitoras, las fibras tipo FF y FR se activan más y con ello son más vulnerables a la excitotoxicidad. Interesantemente, en pacientes con ELA las afectaciones motoras se presentan primero en los músculos más distales de las extremidades (Liu et al., 2019).

En este estudio se reportaron mioclonías transitorias y espasticidad en los miembros posteriores, las cuales ocurrieron sólo en los primeros tres días de tratamiento. Las mioclonías consisten en espasmos breves o sacudidas de grupos musculares o de un sólo músculo. La espasticidad se define como un incremento en el tono muscular debido a un incremento en la excitación o bien por deficiencia en la inhibición (Walker et al., 1990). Ambos efectos desaparecieron a pesar de que la administración de los inhibidores fue continua, posiblemente esto suceda debido a que el bloqueo crónico de la actividad inhibitora provoque procesos compensatorios que restablezcan el balance en la función inhibitora y excitadora. Al conjunto de procesos compensatorios se le conoce como escalada sináptica, que se refiere a una forma de plasticidad para conservar la homeostasis sináptica. El bloqueo prolongado de la actividad (inhibidora o excitadora) conduce a un aumento o facilitación de la transmisión sináptica opuesta (Turrigiano, 2008). En cultivo de neuronas transfectadas del hipocampo, que expresaban un mayor número de canales de potasio, su tasa de disparo estaba disminuida debido a un incremento en la hiperpolarización. Sin embargo, la tasa de disparo se restableció a niveles controles después de algunas horas (Burrone et al., 2002). De manera similar, en cultivo de neuronas espinales se determinó que la inhibición en el circuito excitador (administración de inhibidores glutamatérgicos) en un inicio disminuyó el potencial de acción evocado, el cual se restableció al paso de algunas horas junto con un incremento

en los niveles del receptor AMPA, por el contrario, la activación del circuito excitador (administración de inhibidores GABAérgicos y glicinérgicos) conlleva a un restablecimiento funcional por medio un decremento en los niveles del receptor AMPA (O'Brien et al., 1998). El equilibrio en los circuitos excitadores e inhibidores podría explicarse por medio de balances en el número de receptores, en el número de botones sinápticos, en la cantidad de vesículas sinápticas (Turrigiano, 2008).

Alteraciones celulares provocadas por la administración crónica de inhibidores de la GAD

Además de las alteraciones motoras, la administración crónica de los inhibidores de la GAD produjo un decremento en el número de MNs desde el tercer día de tratamiento así como un incremento en la marca correspondiente a astrocitos, la cual se caracterizó como astrogliá reactiva. Los astrocitos presentes en un sitio de lesión, infección o neurodegeneración sufren cambios morfológicos y funcionales, a lo que se le conoce como activación de la astrogliá o gliosis reactiva. Estos cambios incluyen el aumento en la expresión de la proteína GFAP, hipertrofia o engrosamiento de la célula, expresión de moléculas como EGFR, aumento en la expresión de Lcn2, factores proapoptóticos, entre otros (Alexianu et al., 2001; Anderson et al., 2014; Pekny y Pekna, 2014). En condiciones normales, los astrocitos se encargan de recapturar a los neurotransmisores liberados durante la sinapsis, aportan nutrientes a las neuronas, liberan citosinas que participan en el mantenimiento de la homeostasis del ambiente y representan un reservorio de glucógeno (Brockington et al., 2013; Pekny y Pekna, 2014). Cuando los astrocitos pasan a su forma reactiva, debido a la presencia de factores proinflamatorios y o de microglía activa, se altera la recaptura de glutamato por los astrocitos. En cultivo celular, la adición de TNF-alfa al medio aumenta la recaptura de glutamato y la expresión del transportador GLT1 (Tilleux et al., 2009). En tejido nervioso de pacientes y modelos transgénicos de ELA se ha reportado la presencia de glía reactiva (Kamo et al., 1987; Rafalowska et al., 2010). Algunos trabajos en pacientes proponen que la activación de la glía ocurre previo a la aparición de los síntomas de la ELA y otros han reportado que ocurre en consecuencia de los demás síntomas (Graber et al., 2010; Ringer et al., 2009), mientras que en un modelo de degeneración de MNs se determinó que durante un proceso excitotóxico, inducido de manera crónica, los astrocitos se activan y las MNs se degeneran desde el primer día de tratamiento (Ramirez-Jarquín y Tapia, 2016). La administración crónica en la médula espinal de rata del medio de cultivo de astrocitos con la mutación SODG93A

provocó déficit motor en los músculos inervados por la región administrada y disminuyó el número de MNs del lado ipsilateral a la administración (Ramirez-Jarquin y Tapia, 2017). En nuestro estudio, tanto el incremento en la marca de GFAP como la disminución del número de MNs ocurrieron a partir del tercer día de tratamiento. Al no haber estudiado una etapa previa a la degeneración de las MNs no podemos determinar con claridad si la activación de la glía ocurre previo o en consecuencia al proceso de neurodegeneración.

Actividad de la GAD en la médula espinal de rata y su dependencia al PLP.

Hasta nuestro conocimiento, la actividad de la GAD en la médula espinal de rata no se ha medido, por lo que nuestros resultados son pioneros. En cerebro de rata y ratón, tanto la actividad de la enzima como la actividad dependiente de la coenzima para cada isoforma, sí se ha determinado desde hace años. En cerebro de ratón la actividad de la GAD fue de alrededor de 137 μ moles en ausencia de PLP y de 234 μ moles en presencia de PLP (Tapia et al., 1967), es decir, la actividad incrementó un 70% en presencia del cofactor. La actividad de la GAD medida en la corteza cerebral de ratón fue de alrededor de 56 nmoles de CO_2 por miligramo de proteína en ausencia de PLP y 73 nmoles de CO_2 por miligramo de proteína en presencia de PLP (Abe y Matsuda, 1979), es decir, el PLP incrementó la actividad de la enzima un 35%. En cerebro de rata se determinó que en ratas de 90 días la actividad fue de 60 nmoles en ausencia y 150 nmoles en presencia de PLP (L Massieu et al., 1994), es decir, la actividad en presencia del cofactor fue más del doble de la actividad sin PLP agregado al medio de reacción. En nuestro trabajo se determinó que el promedio de la actividad en ausencia de PLP en el asta ventral derecha e izquierda de la médula espinal de rata fue de 678 pmoles y 711 pmoles, respectivamente. Cuando se agregó PLP a la reacción, la actividad fue de 749 pmoles y 693 pmoles, respectivamente. A diferencia de los datos reportados en cerebro de rata y ratón, en la médula espinal no hubo un aumento en la actividad de la GAD cuando se agregó la coenzima.

En hipocampo de rata se administró mediante microinyección TSC o PLPGH (inhibidores de la isoforma GAD65) y se determinó que la actividad de la GAD se inhibe un 65% y un 50%, respectivamente (tanto del lado inyectado como el contralateral). Esta inhibición se mantiene en el lado ipsilateral pese a la adición de PLP en el medio de

reacción, mientras que en el lado contralateral la inhibición disminuyó siendo de solo el 25%. Es decir, casi se restableció a los niveles del control en presencia de PLP (Tapia y Salazar, 1991). En el presente trabajo, la administración durante 3 días de MPA 20 mM produjo una inhibición del 70% en cada asta ventral, la inhibición por TSC y PLPGH fue del 60% en cada asta ventral. Cuando a la reacción se le agregó la coenzima, la inhibición no disminuyó. Interesantemente, la actividad de la enzima se vio afectada en ambos lados de la médula espinal similar a lo observado en Tapia y Salazar, (1991), a pesar de que la administración se realizó en un solo lado de la médula espinal. Sin embargo, aunque la actividad se afectó en ambos lados, las alteraciones motoras celulares ocurrieron mayormente en el lado ipsilateral. En el lado contralateral las alteraciones motoras y la pérdida de MNs fueron mucho más discretas. Por otro lado, la actividad de la enzima, cuantificada al décimo día de tratamiento no disminuyó de manera significativa respecto al control en ningún caso, a pesar de que la administración de los inhibidores fue continua y el déficit motor fue permanente. Es probable que el bloqueo continuo de la actividad de la GAD provocara procesos compensatorios para equilibrar el balance entre las sinapsis inhibitoras y excitadoras. En este sentido, en un análisis histoquímico por hibridación *in situ* en tejido *postmortem* de pacientes con ELA, se cuantificaron los niveles de GAD en corteza temporal y frontal. Se determinó que los niveles de la GAD en pacientes fueron mayores a los reportados en el grupo control. Interesantemente, el número total de interneuronas positivas para GAD no fue mayor al número de neuronas del tejido control, es decir, el aumento en la marca de la GAD fue ocasionado por un incremento en el número de células (Petri et al., 2006). Cabe mencionar que en etapas tempranas de la enfermedad, lo que se ha determinado es una disminución en la funcionalidad de los circuitos inhibidores (Awiszus y Feistner, 1995; Geevasinga et al., 2017; Grieve et al., 2015; Menon et al., 2015). Así, el aumento en los niveles de la enzima podría ocurrir con el propósito de conservar el equilibrio entre los circuitos excitadores e inhibidores. Esta podría ser la explicación de que al inicio del tratamiento (día 3) encontramos una disminución en la actividad de la GAD, la cual ya no se observó a los 10 días.

Efectos similares provocados por inhibidores diferentes

El déficit motor, la disminución en el número de MNs y la astrogliosis fueron muy similares entre los grupos tratados independientemente con los tres inhibidores, a pesar de que los mecanismos de acción de cada uno son distintos. La única similitud es que todos afectan de una u otra manera a la actividad de la isoforma GAD65; MPA la afecta por ser un inhibidor competitivo, PLPGH y TSC al bloquear la actividad del cofactor. La administración de MPA, que inhibe a ambas isoformas, no produjo un efecto significativamente mayor al ocasionado por la administración de TSC o PLPGH. Con estos resultados llegamos a dos conclusiones, que la inhibición de la isoforma GAD65 es suficiente para ocasionar alteraciones celulares y conductuales, y que la inhibición de la isoforma GAD67 altera en menor medida a la homeostasis de los circuitos GABAérgicos en la médula espinal.

Diversos datos recabados en cerebro de rata y ratón, indican que la síntesis de GABA en las terminales sinápticas depende más de la GAD65 que de la GAD 67. La isoforma GAD65 se localiza en las membranas de las vesículas sinápticas (Buddhala et al., 2009; Martin y Rinvall, 1993) y existe una asociación física entre la GAD65 y el transportador vesicular para GABA (Jin et al., 2003). El GABA que es sintetizado por la GAD65 solo es liberado por medio de vesículas sinápticas mientras que el GABA que es sintetizado por la GAD67 también es liberado de neuronas GABAérgicas en la retina de gato por medio de un transportador reverso dependiente de sodio (Soghomonian y Martin, 1998).

En cerebro de roedor, la GAD65 es más afín al glutamato que la GAD67 (al menos 15 veces más eficiente que la GAD67) (Battaglioli et al., 2003), esto nos podría sugerir que los niveles de GABA podrían depender en mayor medida de la isoforma con mayor afinidad. Sin embargo, esto se estudió en cerebro de ratón, al depletar por separado cada gen que codifica para cada isoforma. Se determinó que los niveles de GABA disminuyen solo cuando se depleta el gen de GAD67 y no se modifican cuando se depleta el gen de la GAD65 (Asada et al., 1997; Asada et al., 1996). Los ratones que carecieron de la expresión de la isoforma GAD67 nacieron con el paladar severamente hendido y murieron pocos días después (Asada et al., 1997). De la misma manera, durante etapas tempranas del desarrollo se incrementan los niveles de GAD67 en comparación con los de GAD65 (Pinal y Tobin, 1998). Estos resultados sugieren que el GABA sintetizado por la GAD67 es

indispensable en procesos de desarrollo de tejidos neuronales y no neuronales y que los niveles de GABA en cerebro dependen en gran medida de esta isoforma.

En médula espinal se ha estudiado muy poco acerca de cada isoforma. Tanto la GAD65 como la GAD67 se localizan en las terminales de los axones que rodean a las MNs en el asta ventral, la mayor diferencia es que la isoforma GAD67 es más abundante que la GAD65 (Feldblum et al., 1995; Gotts et al., 2016; Mackie et al., 2003). Llama la atención que la isoforma GAD67 y la marca para el transportador vesicular de glicina (GLYT2) colocalizan en muchos de los botones que rodean a las motoneuronas, mientras que la marca para GAD65 no coincide con este transportador, es decir, que la isoforma GAD67 es propia de interneuronas que coliberan GABA y glicina mientras que la isoforma GAD65 está presente en interneuronas exclusivamente GABAérgicas (Mackie et al., 2003).

Evidencias de alteraciones en la actividad sináptica inhibitoria en pacientes y modelos de ELA

Numerosos estudios han determinado alteraciones involucradas en la sinapsis inhibitoria, tanto en pacientes como en modelos de ELA. En pacientes sintomáticos con ELAS y en pacientes asintomáticos con ELAF (que aún no mostraban anomalías en el registro de nervios periféricos), se han realizado estudios de resonancia magnética transcraneal, en los que se estimula la corteza motora y se registra en el músculo abductor corto del pulgar. En estos estudios se determinó una disminución en la inhibición intracortical de intervalo corto y un aumento significativo en la facilitación intracortical. Estos parámetros son indicadores de hiperexcitabilidad cortical (Awiszus y Feistner, 1995; Geevasinga et al., 2017; Menon et al., 2015). Es decir, la aparición de alteraciones en el circuito inhibitorio cortical precede a alteraciones en nervios periféricos.

En este sentido, en ratón SOD G93A, se determinó que las neuronas corticales e interneuronas GABAérgicas son hiperexcitables en etapas embrionarias, neonatales y postnatales-sintomáticas (Jiang et al., 2009; Kim et al., 2017). Este incremento en la excitabilidad también se ha reportado en MNs rediferenciadas a partir de fibroblastos de pacientes con ELA, antes y durante el periodo de la degeneración *in vitro* (Wainger et al., 2014). Además, mediante tomografías por emisión de positrones, se determinó una disminución en el área correspondiente a interneuronas GABAérgicas en la corteza motora de pacientes con ELA (Turner et al., 2005).

Por otra parte, en tejido humano, se determinó una mayor expresión de la subunidad GluR2 del receptor tipo AMPA y menor expresión de la subunidad α del receptor GABA_A en MNs de la médula espinal comparada con la expresión de estas proteínas en las neuronas del aparato oculomotor (Brockington et al., 2013), sugiriendo una facilidad en el influjo de Ca²⁺ en MNs espinales y con ello una posible susceptibilidad a la excitotoxicidad.

Estos antecedentes nos sugieren que la degeneración de las MNs en la ELA podría deberse a alteraciones en el circuito inhibitor, principalmente GABAérgico. Nuestros resultados apoyan la conclusión de que un déficit en la síntesis de GABA puede desencadenar alteraciones motoras y celulares como consecuencia del desarrollo de un evento excitotóxico debido a la sobreexcitación de las MNs.

Excitotoxicidad desencadenada por hiperexcitabilidad como mecanismo de degeneración de las MNs.

Se ha propuesto que uno de los mecanismo más importantes que llevan a la degeneración de las neuronas motoras es el mecanismo de excitotoxicidad generado por la entrada exacerbada de Ca²⁺. En pacientes con ELA, es posible que el influjo de Ca²⁺ ocurra tras la sobreactivación de las neuronas motoras, debido a deficiencias en la recaptura de glutamato por los astrocitos (Rothstein et al., 1990; Rothstein et al., 1995). Otra vía por la que se puede generar un proceso excitotóxico podría ser la disminución en la función de los circuitos inhibidores. En el laboratorio se determinó que el bloqueo de la sinapsis GABAérgica desde la postsinapsis produce muerte de MNs debido a un evento excitotóxico (Ramirez-Jarquín et al., 2017). En este trabajo, proponemos que el mecanismo por el cual las MNs se afectaron podría ser un proceso excitotóxico desencadenado por la disminución en la función de las sinapsis inhibitoras promovida por la administración de los inhibidores MPA, TSC, PLPGH. Proponemos que es importante comprobar esta idea administrando inhibidores de receptores glutamatérgicas como MK-801 y CNQX, co-administrados con los inhibidores empleados aquí. De esta manera corroborar si las alteraciones motoras y celulares reportados son dependientes de un incremento en la sinapsis excitadora.

IX.- Conclusión

En este trabajo demostramos que la administración de inhibidores de la GAD en la médula espinal de rata de manera aguda no produce alteraciones conductuales ni celulares. Por el contrario, la administración crónica de los mismos inhibidores produce alteraciones en la conducta motora, pérdida de MNs, y activación de la glía a partir del tercer día de tratamiento. La actividad de la GAD medida al tercer día de tratamiento disminuyó notablemente. Estos resultados en conjunto, sugieren que la inhibición crónica de la actividad de la GAD resulta en un decremento en la función de los circuitos GABAérgicos en el asta ventral, suficiente para causar degeneración de MNs. Probablemente esta degeneración se deba a un proceso excitotóxico desencadenado por el decremento en la función de las sinapsis GABAérgicas. Entender el papel del metabolismo del GABA involucrado en procesos de degeneración de MNs en la médula espinal, podría ayudarnos a dilucidar los mecanismos que producen la pérdida de las neuronas motoras en la ELA.

X.- Referencias

- Abe M., & Matsuda M. (1979). Effect of antivitamin B6 on regional GABA metabolism in mouse brain and its relation to convulsions. *J Nutr Sci Vitaminol*, 25(6), 459-468.
- Alexianu M. E., Kozovska M., & Appel S. H. (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology*, 57(7), 1282-1289. doi:10.1212/wnl.57.7.1282
- Alvarez F. J., Jonas P. C., Sapir T., Hartley R., Berrocal M. C., Geiman E. J., . . . Goulding M. (2005). Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons. *J Comp Neurol*, 493(2), 177-192. doi:10.1002/cne.20711
- Anderson M. A., Ao Y., & Sofroniew M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett*, 565, 23-29. doi:10.1016/j.neulet.2013.12.030
- Asada H., Kawamura Y., Maruyama K., Kume H., Ding R. G., Kanbara N., . . . Obata K. (1997). Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(12), 6496-6499. doi:10.1073/pnas.94.12.6496
- Asada H., Kawamura Y., Maruyama K., Kume H., Ding R., Ji F. Y., . . . Obata K. (1996). Mice Lacking the 65 kDa Isoform of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65) Maintain Normal Levels of GAD67 and GABA in Their Brains but Are Susceptible to Seizures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 229(3), 891-895.
- Awiszus F., & Feistner H. (1995). Comparison of single motor unit responses to transcranial magnetic and peroneal nerve stimulation in the tibialis anterior muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 97(2), 90-95.

- Battaglioli G., Liu H. C., & Martin D. L. (2003). Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. *Journal of Neurochemistry*, *86*(4), 879-887. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01910.x
- Bayon A., Possani L. D., Tapia M., & Tapia R. (1977). Kinetics of brain glutamate decarboxylase. Interactions with glutamate, pyridoxal 5'-phosphate and glutamate-pyridoxal 5'-phosphate Schiff base. *J Neurochem*, *29*(3), 519-525.
- Blizzard C. A., Lee K. M., & Dickson T. C. (2016). Inducing Chronic Excitotoxicity in the Mouse Spinal Cord to Investigate Lower Motor Neuron Degeneration. *Front Neurosci*, *10*, 76. doi:10.3389/fnins.2016.00076
- Bobinac D., Malnar-Dragojevic D., Bajek S., Soic-Vranic T., & Jerkovic R. (2000). Muscle fiber type composition and morphometric properties of denervated rat extensor digitorum longus muscle. *Croat Med J*, *41*(3), 294-297.
- Brady S. T., & Siegel G. J. (2012). *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology, 8th edition*: Academic Press.
- Brockington A., Ning K., Heath P. R., Wood E., Kirby J., Fusi N., . . . Shaw P. J. (2013). Unravelling the enigma of selective vulnerability in neurodegeneration: motor neurons resistant to degeneration in ALS show distinct gene expression characteristics and decreased susceptibility to excitotoxicity. *Acta Neuropathol*, *125*(1), 95-109. doi:10.1007/s00401-012-1058-5
- Buddhala C., Hsu C. C., & Wu J. Y. (2009). A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *Neurochem Int*, *55*(1-3), 9-12. doi:10.1016/j.neuint.2009.01.020
- Burrone J., O'Byrne M., & Murthy V. N. (2002). Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature*, *420*(6914), 414-418. doi:10.1038/nature01242
- Carriedo S. G., Yin H. Z., & Weiss J. H. (1996). Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci*, *16*(13), 4069-4079.
- Choi D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, *1*(8), 623-634.
- Clayton P. T. (2006). B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency. *J Inherit Metab Dis*, *29*(2-3), 317-326. doi:10.1007/s10545-005-0243-2
- Colin-Martinez D. E. (2018). *Diseño de una prueba motora que evalúe la función de los movimientos finos en los modelos agudo y crónico de degeneración de las neuronas motoras lumbares por excitotoxicidad mediada por AMPA*. (Licenciado en Biología), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. .
- Corona J. C., & Tapia R. (2004). AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord in vivo. *J Neurochem*, *89*(4), 988-997. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02383.x
- Corona J. C., & Tapia R. (2007). Ca²⁺-permeable AMPA receptors and intracellular Ca²⁺ determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo. *Neuropharmacology*, *52*(5), 1219-1228. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.12.008
- Corona J. C., Tovar-y-Romo L. B., & Tapia R. (2007). Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*, *11*(11), 1415-1428. doi:10.1517/14728222.11.11.1415
- de Carvalho M., & Swash M. (2016). Lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clin Neurophysiol*, *127*(7), 2670-2681. doi:10.1016/j.clinph.2016.03.024
- Diaz-Munoz M., & Tapia R. (1988). Glutamate decarboxylase inhibition and vitamin B6 metabolism in brain of cirrhotic rats chronically treated with carbon tetrachloride. *J Neurosci Res*, *20*(3), 376-382. doi:10.1002/jnr.490200311

- Du Y. L., & Ryan K. S. (2019). Pyridoxal phosphate-dependent reactions in the biosynthesis of natural products. *Nat Prod Rep*, 36(3), 430-457. doi:10.1039/c8np00049b
- Dunathan H. C. (1966). Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55(4), 712-716. doi:10.1073/pnas.55.4.712
- Erlander M. G., Tillakaratne N. J., Feldblum S., Patel N., & Tobin A. J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, 7(1), 91-100.
- Feldblum S., Dumoulin A., Anoa M., Sandillon F., & Privat A. (1995). Comparative distribution of GAD65 and GAD67 mRNAs and proteins in the rat spinal cord supports a differential regulation of these two glutamate decarboxylases in vivo. *J Neurosci Res*, 42(6), 742-757. doi:10.1002/jnr.490420603
- Fenalti G., Law R. H., Buckle A. M., Langendorf C., Tuck K., Rosado C. J., . . . Whisstock J. C. (2007). GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nat Struct Mol Biol*, 14(4), 280-286. doi:10.1038/nsmb1228
- Geevasinga N., Korgaonkar M. S., Menon P., Van den Bos M., Gomes L., Foster S., . . . Vucic S. (2017). Brain functional connectome abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis are associated with disability and cortical hyperexcitability. *Eur J Neurol*, 24(12), 1507-1517. doi:10.1111/ene.13461
- Gotts J., Atkinson L., Yanagawa Y., Deuchars J., & Deuchars S. A. (2016). Co-expression of GAD67 and choline acetyltransferase in neurons in the mouse spinal cord: A focus on lamina X. *Brain Res*, 1646, 570-579. doi:10.1016/j.brainres.2016.07.001
- Graber D. J., Hickey W. F., & Harris B. T. (2010). Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*, 7, 8. doi:10.1186/1742-2094-7-8
- Grieve S. M., Menon P., Korgaonkar M. S., Gomes L., Foster S., Kiernan M. C., & Vucic S. (2015). Potential structural and functional biomarkers of upper motor neuron dysfunction in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 17(1-2), 85-92. doi:10.3109/21678421.2015.1074707
- Gros-Louis F., Gaspar C., & Rouleau G. A. (2006). Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 1762(11-12), 956-972. doi:10.1016/j.bbadis.2006.01.004
- Harrison N. L., Kugler J. L., Jones M. V., Greenblatt E. P., & Pritchett D. B. (1993). Positive modulation of human gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors by the inhalation anesthetic isoflurane. *Mol Pharmacol*, 44(3), 628-632.
- Hegedus J., Putman C. T., Tyreman N., & Gordon T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol*, 586(14), 3337-3351. doi:10.1113/jphysiol.2007.149286
- Horton R. W. (1980). GABA and seizures induced by inhibitors of glutamic acid decarboxylase. *Brain Research Bulletin*, 5(2), 605-608. doi:10.1016/0361-9230(80)90099-4
- Ishigaki S., & Sobue G. (2018). Importance of Functional Loss of FUS in FTLD/ALS. *Front Mol Biosci*, 5, 44. doi:10.3389/fmolb.2018.00044
- Jiang M., Schuster J. E., Fu R., Siddique T., & Heckman C. J. (2009). Progressive changes in synaptic inputs to motoneurons in adult sacral spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 29(48), 15031-15038. doi:10.1523/JNEUROSCI.0574-09.2009
- Jin H. W. H., Osterhaus G., Wei J., Davis K., Sha D., Floor E., . . . Wu J. Y. (2003). Demonstration of functional coupling between gamma -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 4293-4298.

- Kamo H., Haebara H., Akiguchi I., Kameyama M., Kimura H., & McGeer P. L. (1987). A distinctive distribution of reactive astroglia in the precentral cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 74(1), 33-38.
- Kandel E. R., Schwartz J. H., & Jessell T. M. (1991). *Principles of neural science* (3th ed.): Elsevier.
- Kaufman D. L., Houser C. R., & Tobin A. J. (1991). Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *Journal of Neurochemistry*, 56(2), 720-723. doi:10.1111/j.1471-4159.1991.tb08211.x
- Kiernan M. C., Vucic S., Cheah B. C., Turner M. R., Eisen A., Hardiman O., . . . Zoing M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 377(9769), 942-955. doi:10.1016/S0140-6736(10)61156-7
- Kim J., Hughes E. G., Shetty A. S., Arlotta P., Goff L. A., Bergles D. E., & Brown S. P. (2017). Changes in the Excitability of Neocortical Neurons in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis Are Not Specific to Corticospinal Neurons and Are Modulated by Advancing Disease. *J Neurosci*, 37(37), 9037-9053. doi:10.1523/JNEUROSCI.0811-17.2017
- Lamar C. J. (1970). Mercaptopropionic acid: a convulsant that inhibits glutamate decarboxylase. *Journal of Neurochemistry*, 17(2), 165-170. doi:10.1111/j.1471-4159.1970.tb02197.x
- Liu J., Zhang X., Ding X., Song M., & Sui K. (2019). Analysis of clinical and electrophysiological characteristics of 150 patients with amyotrophic lateral sclerosis in China. *Neurol Sci*, 40(2), 363-369. doi:10.1007/s10072-018-3633-6
- Lopez M. L. B. (2003). *Capacidad oxidativa de los músculos respiratorios y periféricos en la EPOC*. (Doctor en Medicina), Universidad Autónoma de Barcelona.
- Mackie M., Hughes D. I., Maxwell D. J., Tillakaratne N. J., & Todd A. J. (2003). Distribution and colocalisation of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord. *Neuroscience*, 119(2), 461-472.
- Mai J. K., Paxinos, G. (2011). *The Human Nervous System* (3th ed.): Elsevier.
- Malessa S., Leigh P. N., Bertel O., Sluga E., & Hornykiewicz O. (1991). Amyotrophic lateral sclerosis: glutamate dehydrogenase and transmitter amino acids in the spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 54(11), 984-988. doi:10.1136/jnnp.54.11.984
- Martin D. L., Martin S. B., Wu S. J., & Espina N. (1991). Regulatory properties of brain glutamate decarboxylase (GAD): the apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. *Journal of Neuroscience*, 11(3), 2725-2731. doi:10.1523/JNEUROSCI.11-09-02725.1991
- Martin D. L., & Rinvall K. (1993). Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem*, 60(2), 395-407.
- Massieu G. H., Tapia R., & Ortega B. G. (1962). Free amino acids in brain of mice treated with L-glutamic acid- γ -hydrazide. *Biochemical Pharmacology*, 11, 976-979.
- Massieu L., Rivera A., & Tapia R. (1994). Convulsions and inhibition of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate-gamma-glutamyl hydrazone in the developing rat. *Neurochem Res*, 19(2), 183-187.
- McCarson K. E., & Enna S. J. (2014). GABA pharmacology: the search for analgesics. *Neurochem Res*, 39(10), 1948-1963. doi:10.1007/s11064-014-1254-x
- Menon P., Kiernan M. C., & Vucic S. (2015). Cortical hyperexcitability precedes lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clin Neurophysiol*, 126(4), 803-809. doi:10.1016/j.clinph.2014.04.023

- Niebroj-Dobosz I., Janik P., & Kwiecinski H. (2002). Effect of Riluzole on serum amino acids in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, 106(1), 39-43.
- O'Brien R. J., Kamboj S., Ehlers M. D., Rosen K. R., Fischbach G. D., & Huganir R. L. (1998). Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron*, 21(5), 1067-1078. doi:10.1016/s0896-6273(00)80624-8
- Olsen R. W., & Sieghart W. (2008). Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev*, 60(3), 243-260. doi:10.1124/pr.108.00505
- Pekny M., & Pekna M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*, 94(4), 1077-1098. doi:10.1152/physrev.00041.2013
- Petri S., Kollwe K., Grothe C., Hori A., Dengler R., Bufler J., & Krampfl K. (2006). GABA(A)-receptor mRNA expression in the prefrontal and temporal cortex of ALS patients. *J Neurol Sci*, 250(1-2), 124-132. doi:10.1016/j.jns.2006.08.005
- Pinal C. S., & Tobin A. J. (1998). Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspect Dev Neurobiol*, 5(2-3), 109-118.
- Rafalowska J., Dziewulska D., Gadamski R., Chrzanowska H., Modrzewska-Lewczuk M., & Grieb P. (2010). Is the spinal cord motoneuron exclusively a target in ALS? Comparison between astroglial reactivity in a rat model of familial ALS and in human sporadic ALS cases. *Neurol Res*, 32(8), 867-872. doi:10.1179/174313209X414542
- Ramirez-Jarquin U. N., Lazo-Gomez R., Tovar Y. R. L. B., & Tapia R. (2014). Spinal inhibitory circuits and their role in motor neuron degeneration. *Neuropharmacology*, 82, 101-107. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.003
- Ramirez-Jarquin U. N., Rojas F., van Zundert B., & Tapia R. (2017). Chronic infusion of SOD1(G93A) astrocyte-secreted factors induces spinal motoneuron degeneration and neuromuscular dysfunction in healthy rats. *J Cell Physiol*, 232(10), 2610-2615. doi:10.1002/jcp.25827
- Ramirez-Jarquin U. N., & Tapia R. (2016). Neuropathological characterization of spinal motor neuron degeneration processes induced by acute and chronic excitotoxic stimulus in vivo. *Neuroscience*, 331, 78-90. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.06.021
- Ramirez-Jarquin U. N., & Tapia R. (2017). Chronic GABAergic blockade in the spinal cord in vivo induces motor alterations and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, 117, 85-92. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.01.040
- Ringer C., Weihe E., & Schutz B. (2009). Pre-symptomatic alterations in subcellular betaCGRP distribution in motor neurons precede astrogliosis in ALS mice. *Neurobiol Dis*, 35(2), 286-295. doi:10.1016/j.nbd.2009.05.011
- Robinson L. R. (2000). Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*, 23(6), 863-873. doi:10.1002/(sici)1097-4598(200006)23:6<863::aid-mus4>3.0.co;2-0
- Rothstein J. D., Martin L. J., & Kuncl R. W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 326(22), 1464-1468. doi:10.1056/NEJM199205283262204
- Rothstein J. D., Tsai G., Kuncl R. W., Clawson L., Cornblath D. R., Drachman D. B., . . . Coyle J. T. (1990). Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 28(1), 18-25. doi:10.1002/ana.410280106
- Rothstein J. D., Van Kammen M., Levey A. I., Martin L. J., & Kuncl R. W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 38(1), 73-84. doi:10.1002/ana.410380114

- Salazar P., & Tapia R. (2015). Epilepsy and hippocampal neurodegeneration induced by glutamate decarboxylase inhibitors in awake rats. *Epilepsy Res*, 116, 27-33. doi:10.1016/j.eplepsyres.2015.06.014
- Santa-Cruz L. D., Ramirez-Jarquín U. N., & R. T. (2012). Role of mitochondrial dysfunction in motor neuron degeneration in ALS. In H. M. Maurer (Ed.), *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (pp. 197-224): InTech.
- Selvaraj B. T., Livesey M. R., Zhao C., Gregory J. M., James O. T., Cleary E. M., . . . Chandran S. (2018). C9ORF72 repeat expansion causes vulnerability of motor neurons to Ca²⁺-permeable AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Commun*, 9(1), 347. doi:10.1038/s41467-017-02729-0
- Siesjö B. K. (1994). Calcium-mediated processes in neuronal degeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 747, 140-161.
- Soghomonian J. J., & Martin D. L. (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci*, 19(12), 500-505. doi:10.1016/s0165-6147(98)01270-x
- Tallon C., Russell K. A., Sakhalkar S., Andrapallayal N., & Farah M. H. (2016). Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice. *Neuroscience*, 312, 179-189. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.11.018
- Tapia R., & Awapara J. (1969). Effects of various substituted hydrazones and hydrazines of pyridoxal-5-phosphate on brain glutamate decarboxylase. *Biochemical Pharmacology*, 18, 145-152.
- Tapia R., Perez de la Mora M., & Massieu G. H. (1967). Modifications of brain glutamate decarboxylase activity by pyridoxal phosphate- γ -glutamyl hydrazone. *Biochemical Pharmacology*, 16, 1211-1218.
- Tapia R., & Salazar P. (1991). Glutamate decarboxylase activity in the substantia nigra and the hippocampus of rats microinjected with inhibitors of the enzyme. *Neurochem Res*, 16(3), 263-267.
- Tilleux S., Goursaud S., & Hermans E. (2009). Selective up-regulation of GLT-1 in cultured astrocytes exposed to soluble mediators released by activated microglia. *Neurochem Int*, 55(1-3), 35-40. doi:10.1016/j.neuint.2008.12.021
- Tiryaki E., & Horak H. A. (2014). ALS and other motor neuron diseases. *Continuum (Minneapolis)*, 20(5 Peripheral Nervous System Disorders), 1185-1207. doi:10.1212/01.CON.0000455886.14298.a4
- Torii Y., Goto Y., Takahashi M., Ishida S., Harakawa T., Sakamoto T., . . . Ginnaga A. (2010). Quantitative determination of biological activity of botulinum toxins utilizing compound muscle action potentials (CMAP), and comparison of neuromuscular transmission blockage and muscle flaccidity among toxins. *Toxicon*, 55(2-3), 407-414. doi:10.1016/j.toxicon.2009.09.005
- Toth E. L. A. (1988). 3-Mercaptopropionic acid administration into the caudate-putamen of the rat provokes dyskinesia. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 29(3), 525-528. doi:10.1016/0091-3057(88)90014-7
- Tovar-Y-Romo L. B., Santa-Cruz L. D., Zepeda A., & Tapia R. (2009). Chronic elevation of extracellular glutamate due to transport blockade is innocuous for spinal motoneurons in vivo. *Neurochem Int*, 54(3-4), 186-191. doi:10.1016/j.neuint.2008.09.015
- Tovar-Y-Romo L. B., Zepeda A., & Tapia R. (2007). Vascular endothelial growth factor prevents paralysis and motoneuron death in a rat model of excitotoxic spinal cord neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66(10), 913-922. doi:10.1097/nen.0b013e3181567c16

- Towfighi J., Kofke W. A., O'Connell B. K., Housman C., & Graybeal J. M. (1989). Substantia nigra lesions in mercaptopropionic acid induced status epilepticus: a light and electron microscopic study. *Acta Neuropathol*, 77(6), 612-620.
- Tunncliffe G. (1990). Action of inhibitors on brain glutamate decarboxylase. *Int J Biochem*, 22(11), 1235-1241.
- Turner M. R., Hammers A., Al-Chalabi A., Shaw C. E., Andersen P. M., Brooks D. J., & Leigh P. N. (2005). Distinct cerebral lesions in sporadic and 'D90A' SOD1 ALS: studies with [11C]flumazenil PET. *Brain*, 128(Pt 6), 1323-1329. doi:10.1093/brain/awh509
- Turrigiano G. G. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell*, 135(3), 422-435. doi:10.1016/j.cell.2008.10.008
- Van Den Bosch L., Vandenberghe W., Klaassen H., Van Houtte E., & Robberecht W. (2000). Ca(2+)-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci*, 180(1-2), 29-34.
- Wainger B. J., Kiskinis E., Mellin C., Wiskow O., Han S. S., Sandoe J., . . . Woolf C. J. (2014). Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep*, 7(1), 1-11. doi:10.1016/j.celrep.2014.03.019
- Walker H. K., Hall W. D., & Hurst J. W. (1990). *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. (3rd ed.).
- Watson C., Paxinos, G., Kayalioglu, G. (2009). *The Spinal Cord: A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas* (1st ed.): Elsevier.
- Wood J. D., A. D. (1971). The comparative effects of various hydrazides on -aminobutyric acid and its metabolism. *Journal of Neurochemistry*, 18, 1017-1025.