

64 2e1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA
GLUTAMATO DESCARBOXILASA CEREBRAL
Y EL CONTROL DE LA EXCITABILIDAD
NEURONAL, DURANTE EL DESARROLLO"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ROSA MARIA HERNANDEZ GARIBAY



MEXICO, D. F.

1990

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

La actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD, EC 4.1.1.15) en homogenados de corteza frontal, cerebelo, hipocampo y cuerpo estriado de ratas en desarrollo, de 5 edades diferentes, se determinó por un método radiométrico basado en la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -ácido glutámico en presencia y ausencia de su coenzima, el fosfato de piridoxal (PLP). En las cuatro regiones estudiadas se observó que la actividad de la GAD se incrementó con respecto a edades tempranas (10 a 15 días), pero disminuyó en etapas adultas (90 días). Esta discrepancia puede deberse a que el incremento de la proteína con respecto a la edad no sea directamente proporcional al incremento de la actividad de la enzima (GAD). La región que alcanza más rápido el máximo de actividad con respecto al desarrollo es la corteza frontal a los 15 días (50.8 nmoles de CO_2 /mg de proteína/20 minutos), seguida de estriado (48), cerebelo (45.3) e hipocampo (41.6)

El aumento de la actividad de la GAD durante el desarrollo de la rata varía en las distintas regiones estudiadas.

En cuanto a la activación por PLP es bien sabido que el papel de esta coenzima en la actividad de la GAD es fundamental ya que sin ella se modifica importantemente la producción de GABA. La mayor activación observada fue en hipocampo y en cuerpo estriado en etapas tempranas del desarrollo de la rata.

I. INTRODUCCION

Desde 1950 en que se descubrió la presencia del ácido γ -aminobutírico (GABA) en el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados, se han encontrado múltiples evidencias a favor de su papel como el neurotransmisor inhibitorio más abundantemente distribuido.

La biosíntesis del GABA se lleva a cabo por la glutamato descarboxilasa (GAD), enzima que cataliza la α descarboxilación del ácido glutámico. La degradación se realiza a través de una reacción de transaminación con α -cetoglutarato por la transaminasa del GABA. Ambas enzimas dependen del fosfato de piridoxal (PLP) como coenzima (forma activa de la vitamina B₆).

La importancia de la GAD como paso limitante en la síntesis del GABA fué evidente desde los estudios iniciales en que mostraron la relación entre la inhibición de la GAD in vivo y la aparición de convulsiones.

Aunque algunos compuestos endógenos pueden modificar la actividad de la GAD -por ejemplo, el zinc o el α -cetoglutarato- (Tower, 1976), existe mucha evidencia de que el PLP juega un papel fundamental en su regulación. La dependencia de la actividad de la GAD por el PLP es un fenómeno que ocurre no solamente in vitro, sino también in vivo como se espera de un regulador fisiológico (Tapia y cols., 1975b; Tapia y Meza Ruiz, 1975; Sims y Pitts, 1970). Cuando la concentración de PLP se disminuye farmacológicamente en el cerebro, inhibiendo a la cinasa de piridoxal, o como consecuencia de una dieta deficiente de piridoxina, la actividad de la GAD disminuye. Estas

manipulaciones de los niveles de PLP suelen resultar en convulsiones en los animales de experimentación y mas aún, Tower ha mostrado que en niños con dietas deficientes en piridoxina sufren convulsiones que desaparecen al administrar vitamina B₆ intravenosamente (Tower, 1976). En cerebro de ratón se ha reportado que algunas propiedades de la GAD, tales como sensibilidad a la hipotonicidad, al Tritón X-100, centrifugación y calentamiento a 37°C, son diferentes entre la GAD del recién nacido y la GAD del adulto (Tapia y Meza Ruiz, 1975; 1976).

La presencia, en el recién nacido, de una forma de GAD susceptible a cambios ambientales podría explicar el patrón de excitabilidad diferente, mostrada en animales jóvenes comparado con adultos.

El objetivo de la presente tesis es valorar la actividad de la GAD en regiones del sistema nervioso central involucradas con la conducta motora (cerebelo, corteza frontal, hipocampo y cuerpo estriado) durante el desarrollo ontogénico de la rata y los cambios en la activación por su coenzima, el PLP.

manipulaciones de los niveles de PLP suelen resultar en convulsiones en los animales de experimentación y más aún, Tower ha mostrado que en niños con dietas deficientes en piridoxina sufren convulsiones que desaparecen al administrar vitamina B₆ intravenosamente (Tower, 1976). En cerebro de ratón se ha reportado que algunas propiedades de la GAD, tales como sensibilidad a la hipotonicidad, al Tritón X-100, centrifugación y calentamiento a 37°C, son diferentes entre la GAD del recién nacido y la GAD del adulto (Tapia y Meza Ruiz, 1975; 1976).

La presencia, en el recién nacido, de una forma de GAD susceptible a cambios ambientales podría explicar el patrón de excitabilidad diferente, mostrada en animales jóvenes comparado con adultos.

El objetivo de la presente tesis es valorar la actividad de la GAD en regiones del sistema nervioso central involucradas con la conducta motora (cerebelo, corteza frontal, hipocampo y cuerpo estriado) durante el desarrollo ontogénico de la rata y los cambios en la activación por su coenzima, el PLP.

II. ANTECEDENTES

II.1. Antecedentes históricos

Entre los resultados más notables producidos por la investigación sobre la organización del sistema nervioso, surge a finales del siglo XIX, la teoría neuronal la cual desterró la idea de estructura reticular o de sincitio (en forma de redes) del SNC, sostenida por Camilo Golgi, quien postuló que las neuronas son las unidades anatómicas y funcionales del sistema nervioso y que la comunicación entre ellas debía entenderse en términos de una continuidad fisiológica y no física.

La falta de continuidad anatómica está dada por el espacio sináptico de aproximadamente 20 nm que impide el paso directo del impulso eléctrico. Estos hallazgos llevaron a plantear una teoría química de la comunicación neuronal.

La teoría química de la transmisión sináptica se inició en 1848 con Du Bois Raymond, quien postuló una sustancia química excitadora como la responsable de la contracción muscular. En 1897 Sherrington propone el término sinapsis. En 1904 T.R. Elliot, sugiere que la adrenalina podría ser un neurotransmisor secretado en las terminales de los nervios simpáticos y 20 años más tarde O. Lewi demuestra que al estimular el nervio vago se libera una sustancia capaz de inhibir el latido cardiaco. Actualmente son numerosos los neurotransmisores postulados y las bases de la sinaptología se encuentran muy consolidadas.

Las terminaciones nerviosas, axones y dendritas (célula presináptica) permiten a las células establecer conexiones entre sí; de esta manera se integran circuitos que pueden ser formados por dos o más neuronas. Las terminaciones establecen contacto con otras neuronas (células postsinápticas) por medio de uniones que se conocen como sinapsis (Figura 1).

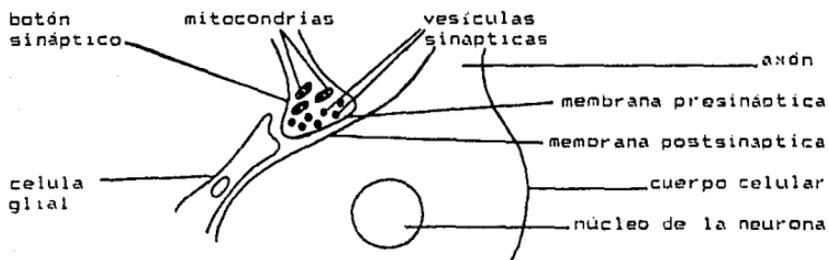


Figura 1. Representación esquemática de una sinapsis. Tomada del libro Bioquímica Médica, Newsholme y Leech, página 647 Ed. Interamericana, 1987.

Las sinapsis representan sitios especializados de las superficies de las neuronas que son capaces de conectar a unas con otras, permitiendo el paso del impulso nervioso, generalmente en un solo sentido.

La membrana de las células poseen una diferencia de potencial, siendo el interior de las mismas negativo respecto al exterior. Por convención este potencial de reposo de la membrana se escribe con un signo menos.

Un potencial de acción nervioso (PA) o impulso nervioso se inicia en una región de la membrana en respuesta a un estímulo superior a un nivel umbral. Esto se detecta primero por una rápida deflexión del potencial interno de reposo, de su valor negativo hacia cero, y luego sin interrupción hacia valores positivos. Esta reversión local del potencial de membrana se debe a un repentino aumento selectivo de la permeabilidad de la membrana al ion sodio que fluye rápidamente en dirección a su gradiente de concentración. Rápidamente la membrana se repolariza a causa del aumento de la permeabilidad al potasio.

II.2. Transmisión sináptica.

Un neurotransmisor se consideraba como una sustancia química que, se liberaba de la neurona como respuesta de la llegada de un impulso nervioso capaz de modificar la excitabilidad de la célula postsináptica en donde ejercía su acción. R. Werman intenta, en 1966, formalizar los criterios para la identificación de mediadores químicos en el sistema nervioso. Sin embargo no intenta definir lo que es un neurotransmisor en relación con los criterios de identificación utilizados anteriormente sino a la luz de los nuevos postulados que sugiere. Los criterios fisiológicos y farmacológicos utilizados en esa época se enriquecieron por nuevas técnicas de registro por medio de microelectrodos y con el enfoque bioquímico experimental aplicado al problema. De esta manera Werman establece seis criterios básicos para que una sustancia pueda ser considerada como neurotransmisor:

1) Identidad de acción: el transmisor propuesto debe inducir el mismo resultado que el transmisor natural en la célula postsináptica. Es decir, debe modificar a través de los mismos mecanismos la conductancia iónica de la membrana.

2) Presencia de enzimas determinantes de la síntesis del transmisor putativo en la neurona que lo produce.

3) Inactivación. Presencia de un sistema determinante de la eliminación del transmisor una vez efectuada su acción

4) Presencia. El transmisor propuesto debe estar presente en la neurona que lo produce y encontrarse potencialmente accesible para su utilización.

5) Liberación del transmisor. Durante la estimulación nerviosa, la sustancia transmisora debe ser detectada en el fluido extracelular de la región de la sinapsis activada.

6) Identidad farmacológica. Agentes farmacológicos que interactúen con elementos de la transmisión sináptica deben modificar los efectos que produce el neurotransmisor fisiológico.

Se ha aceptado que un mediador químico se libera de los elementos presinápticos cuando las aferentes a esa neurona son estimuladas. Esto involucra la activación de los mecanismos de liberación por el incremento en la concentración interna de iones calcio en las terminales nerviosas.

De los neurotransmisores inhibidores del sistema nervioso central, el más ampliamente distribuido es el ácido γ -aminobutírico (GABA).

11.3. Acido γ -Aminobutírico (GABA).

La existencia del GABA en el cerebro se descubrió en 1950, simultánea pero independientemente por Roberts y Awapara. El interés por el estudio de este aminoácido se originó, inicialmente, por el hallazgo de que su concentración más importante se alcanza en el SNC, a diferencia de otros órganos (Wu, 1978), y porque con técnicas neurofisiológicas se demostró que el GABA tenía efectos inhibidores en la sinapsis.

La concentración total en el cerebro humano es de 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido (Tapia, 1983).

La inhibición post-sináptica es debida a la hiperpolarización, como resultado de la interacción del GABA con su receptor, que da como resultado un aumento en el flujo del ión Cl^- . La inhibición mediada por el GABA es uno de los mecanismos fundamentales de la regulación de la actividad neuronal.

11.3.1. Metabolismo del GABA.

A diferencia de otras vías metabólicas, que son multienzimáticas, la descarboxilasa del ácido L-glutámico (EC 4.1.1.15) es el único paso, y por consiguiente el limitante, en la vía biosintética del GABA. Este sistema enzimático está constituido por los siguientes elementos: El sustrato que es el aminoácido L-glutámico (Figura 2).

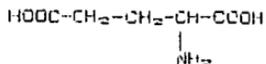


Figura 2. Estructura química del ácido L-glutámico.

La apoenzima que es la GAD y la coenzima que es el fosfato de piridoxal (PLP, la forma activa de la vitamina B₆).

La piridoxal cinasa cataliza la transferencia del grupo fosforil del ATP al grupo hidroximetil del piridoxal, formando PLP. Figura 3.

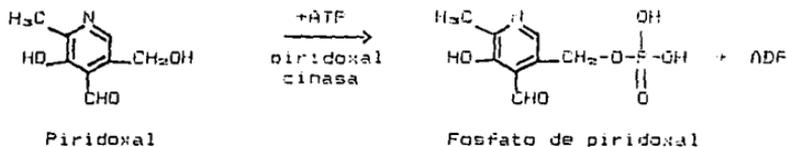


Figura 3. Reacción de fosforilación del piridoxal por transferencia del grupo fosforilo del ATP y la enzima piridoxal cinasa, con la subsecuente formación de Fosfato de piridoxal (PLP).

La GAD lleva a cabo la descarboxilación del carbonilo 1 del ácido glutámico, dando como productos directamente GABA y dióxido de carbono (Tapia, 1983 ; Kuriyama, 1966) Figura 4.

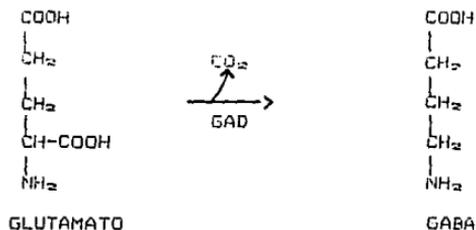


Figura 4. Biosíntesis del GABA.

La enzima requiere de fosfato de piridoxal para poder llevar a cabo la descarboxilación del sustrato. Este mecanismo involucra la formación de una base de Schiff entre el PLP y el aminoácido, seguida por la descarboxilación, y un protón del medio reemplaza el enlace entre el carbono α y el carboxilo. (Figura 5).

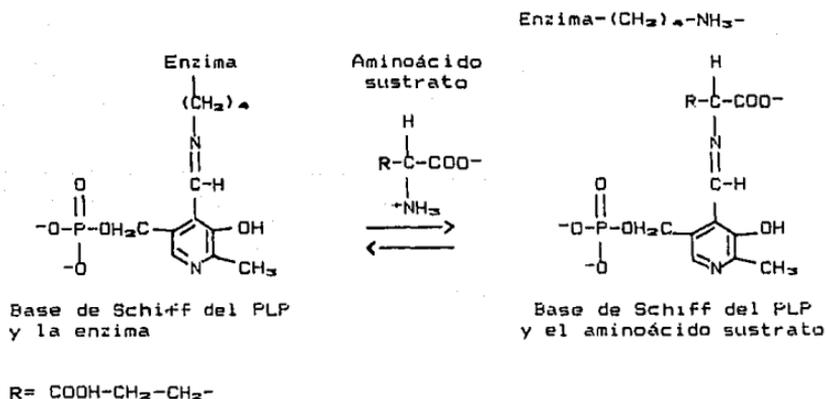


Figura 5. Formación de la base de Schiff con el grupo aldehído del PLP y el ácido L-glutámico. Tomada del libro Biochemistry, Stryer Lubert, 2a. edición, pág. 409.

La GAD, en contraste con otras enzimas dependientes de vitamina B₆, es susceptible a deficiencias de PLP in vivo e in vitro (Tapia y cols., 1975b, Sims y Pitts, 1970; Tower, 1976).

La degradación metabólica del GABA se lleva a cabo mediante la actividad de la transaminasa del GABA (GABA-T), enzima que también requiere de fosfato de piridoxal como coenzima.

La GABA-T cataliza la transferencia del grupo amino del GABA al ácido α -cetoglutárico, dando como productos semialdehído succínico y ácido glutámico (Figura 6).

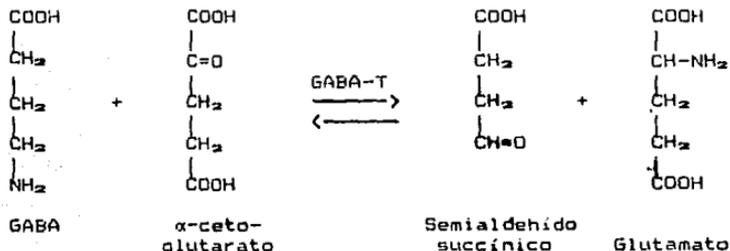


Figura 6. Transaminación del GABA catalizada por la GABA-T.

Durante el catabolismo del GABA se regenera ácido glutámico; de aquí podría concluirse que éste estaría nuevamente disponible para servir como precursor del GABA, dando la impresión de un ciclo. Sin embargo, es sabido que la transaminasa más importante desde el punto de vista cuantitativo en el cerebro es la transaminasa glutámico-oxalacética, enzima que al catalizar la transaminación entre los ácidos aspártico y α -cetoglutárico da origen a la mayor parte de la alta concentración de glutamato que existe en el tejido nervioso. Se ha demostrado que en este tejido el glutamato prácticamente está formando parte del ciclo de Krebs, pues está en un equilibrio dinámico de rápida interconversión con el α -cetoglutarato. Recientemente, utilizando estudios con resonancia magnética nuclear se ha encontrado que la mayor parte del GABA sintetizado en el cerebro

proviene de una poza de glutamato que deriva de intermediarios del ciclo de Krebs a partir de la vía anaplerótica que involucra a la piruvato carboxilasa (PC) que transforma el ácido pirúvico a ácido oxalacético (Brainard y cols., 1989). Figura 7.

Se han descrito vías alternas para la síntesis del GABA. El γ -hidroxibutirato (GHBA) puede formarse a partir del GABA en el cerebro, así como el GHBA puede ser convertido a GABA por una ruta inversa.

Algunas poliaminas, han sido probadas como posibles precursores del GABA en el cerebro. Una de éstas es la putrescina (1,4- diamino butirato), que probablemente sea un precursor de GABA en el cerebro de pez. Los resultados experimentales sugieren que la putrescina es un importante precursor del GABA en el cerebro de especies de sangre fría.

Hace algunos años, se demostró que en el cerebro de ratón existe una ruta metabólica a partir de la putrescina, vía monoacetil putrescina y ácido N-acetil- γ -aminobutírico a GABA. Los pasos principales de esta ruta se muestran en la figura 8. (Seiler y cols., 1973).

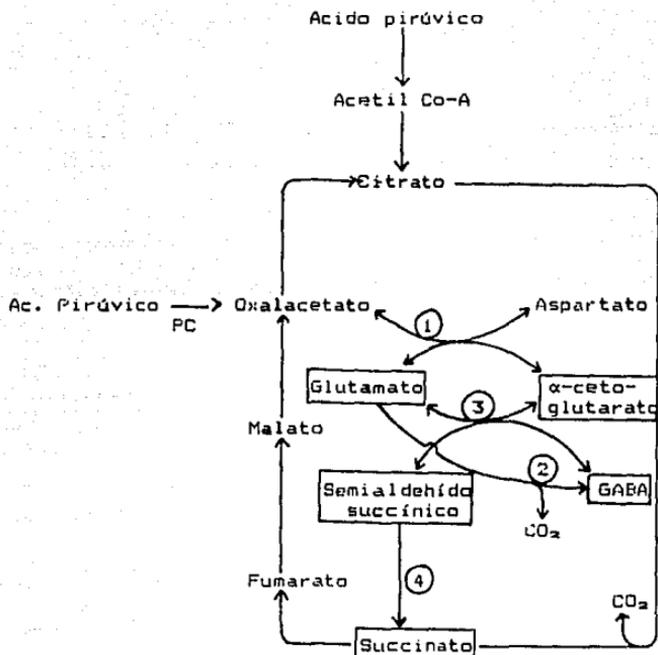


Figura 7. Relaciones entre el ciclo de Krebs y el metabolismo del GABA. Las reacciones numeradas 1 a 4 representan la secuencia de la producción del GABA dentro del ciclo. Tomada del libro Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas, Pasantes-Morales y Aréchiga, pág.60

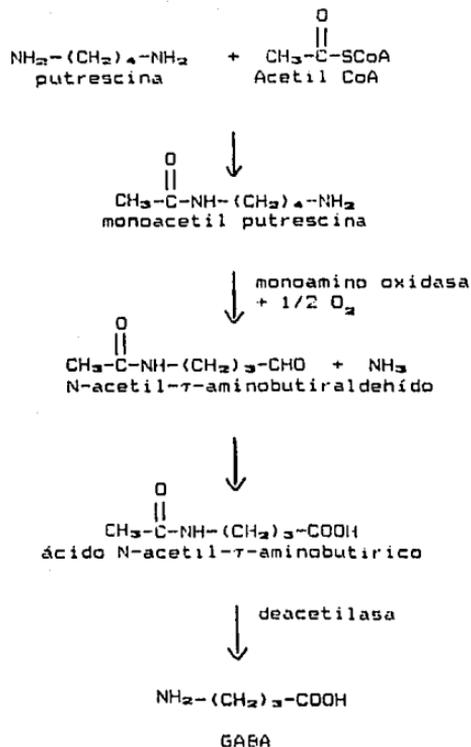


Figura 8. Ruta metabólica del GABA a partir de la putrescina en el cerebro de pez. Tomada del libro GABA in Nervous System Function (Roberts, E., Chase, T.N., y Tower, D.B., eds). Raven Press, New York. pp. 62-63.

II.3.1.1. Glutamato Descarboxilasa (GAD).

La GAD (EC 4.1.1.15) ha sido completamente purificada del cerebro de ratón (Wu, 1973) y del cerebro de conejo (Brandon, 1986). Y se han hecho intentos de purificación del cerebro de la rata (Oertel, y col., 1980) y del hombre. Además se han realizado estudios en GAD semipurificada de cerebro de cerdo (Martin y cols., 1980). Tiene un peso molecular de aproximadamente 90,000 daltones y es posible que esté formada por seis subunidades de 15,000 daltones.

Se han preparado anticuerpos contra la enzima purificada o semipurificada, los cuales han sido utilizados para localizar con métodos inmunohistoquímicos algunas de las vías GABA-érgicas en el SNC (Oertel y col., 1980).

II.3.1.2. Relaciones entre el fosfato de piridoxal y actividad de la GAD.

La regulación de la actividad de la GAD parece llevarse a cabo fundamentalmente por medio de su coenzima, el fosfato de piridoxal (PLP) (Meldrum, 1975; Tapia y Meza Ruíz, 1975; Baxter, 1976; Tower, 1976).

No solamente la GAD es activada notablemente cuando se agrega la coenzima al medio de incubación in vitro, sino que además existen numerosas evidencias que indican casi con toda seguridad, que la actividad de la GAD depende del PLP también in vivo. Se ha demostrado que la actividad de la GAD disminuye

cuando se inyectan a los animales drogas que inhiben la cinasa de piridoxal (enzima que cataliza la fosforilación del piridoxal, paso limitante en la síntesis de la coenzima) o cuando se les alimenta con una dieta deficiente de piridoxina (Dakshinamurti, y Stephens, 1969). Esta disminución de la actividad de la GAD se revierte, tanto por la administración in vivo de piridoxina, como por la adición de PLP in vitro a las mezclas de incubación (Tapia y cols., 1975b). Estos resultados indican que la disponibilidad del PLP en el cerebro es, uno de los mas importantes mecanismos reguladores de la actividad de la GAD. Bayón y cols. (1977), determinaron la actividad enzimática de la GAD en cerebros completos de ratón adulto, a través del comportamiento cinético, con un amplio límite de concentraciones de glutamato y PLP. Los resultados demostraron que existen dos actividades diferentes de la GAD, una dependiente y otra independiente de la concentración de PLP libre. Este modelo cinético sugiere que los dos tipos de actividad de la GAD son independientes y no pueden ser interconvertidos por cambios en la concentración del sustrato o del cofactor.

II.3.1.3. Inhibición de la GAD in vivo e in vitro.

La inhibición de la GAD in vivo e in vitro puede llevarse a cabo de tres maneras diferentes:

Primero: Por inhibición competitiva con el sustrato glutamato, por medio del ácido 3-mercaptopropiónico y otros compuestos (Horton y Meldrum, 1973).

Segundo: La inhibición competitiva de la unión del cofactor, PLP, a la GAD con antagonistas del PLP, tales como la metoxipiridoxina (Nitsch, 1980) y deoxipiridoxina (Horton y Meldrum, 1973).

Tercero: Inactivación del PLP por la formación de PLP-hidrazona estable (Meldrum y col., 1975).

II.3.2. GAD en el desarrollo.

Algunas propiedades de la GAD son diferentes en el cerebro del recién nacido comparadas con las del adulto. En el ratón recién nacido, la GAD es inactivada por centrifugación, adición de Tritón X-100 y preincubación a 37°C, mientras que la enzima del adulto sólo se afecta parcialmente por estas condiciones. Además la GAD del recién nacido se activa menos por el PLP que la enzima del adulto (Tapia y Meza Ruiz, 1975; 1976).

La presencia en el recién nacido, de una forma de GAD que es susceptible a cambios ambientales, puede explicar las diferencias de excitabilidad motora mostradas por animales jóvenes en comparación con los adultos (Purpura, 1969; Tapia y col., 1975a). Es particularmente interesante la susceptibilidad de la GAD, del recién nacido a la temperatura, ya que esto podría

estar relacionado con las convulsiones febriles en niños como resultado de la inhibición de la GAD. La susceptibilidad a convulsiones febriles en humanos y en animales de experimentación, es un fenómeno transitorio que depende de la edad, posiblemente como resultado de la inmadurez de los mecanismos que controlan la excitabilidad cerebral (Millichap, 1959; Lenox-Buchthal, 1970). Aunque la frecuencia de convulsiones febriles es una complicación pediátrica común, todavía no se conocen sus mecanismos neuroquímicos.

Sims y Pitts (1970) realizaron un microensayo radiométrico en cerebros completos de ratas, desde cero hasta ciento sesenta días de edad. En los resultados obtenidos se ha encontrado que la actividad de la GAD cerebral se incrementa durante el desarrollo, aproximadamente desde 4.2 $\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo/hora, en cero días hasta 46.2 $\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo /hora, en 160 días de edad (Tabla 1).

TABLA 1. Actividad de la GAD en cerebros completos de rata durante el primer mes de vida.

Edad (días)	Animales (N)	Actividad ($\mu\text{mol/g}$ peso h�m./h. \pm S.E.M.)
0	6	4.2 \pm 0.2
1	7	5.1 \pm 0.5
2	9	5.2 \pm 0.3
3	10	5.9 \pm 0.1
4	7	6.3 \pm 0.1
5	7	6.9 \pm 0.2
6	6	7.9 \pm 0.4
7	6	9.0 \pm 0.4
8	8	11.0 \pm 0.2
9	12	12.3 \pm 0.3
10	8	14.6 \pm 0.4
11	8	16.7 \pm 0.4
12	8	19.5 \pm 0.9
13	8	22.0 \pm 0.4
14	8	24.3 \pm 0.6
15	8	26.2 \pm 0.6
16	9	28.3 \pm 1.8
17	7	30.3 \pm 0.5
18	6	32.1 \pm 1.1
19	6	33.0 \pm 1.7
20	7	33.1 \pm 1.0
21	7	33.1 \pm 0.9
22	6	38.3 \pm 0.6
23	8	42.2 \pm 1.0
24	6	41.6 \pm 0.6
25	6	41.6 \pm 1.0
26	6	42.3 \pm 0.6
27	6	43.6 \pm 1.2
28	6	44.1 \pm 0.7
29	7	44.8 \pm 0.9
30	7	45.3 \pm 0.4
160	10	46.2 \pm 0.5

Tomada del articulo de Sims y Pitts, 1970.

II.3.3. Formas moleculares de la GAD.

Algunos estudios llevados a cabo por Denner y Wu en 1985 han propuesto que hay dos formas de GAD encontradas en el cerebro de ratas adultas. La forma A que no requiere de PLP exógeno para su actividad y otra forma B que si lo requiere. Estas dos formas difieren enormemente en su sensibilidad a la temperatura, inactivación y reactivación por eliminación y adición de PLP exógeno, por la movilidad electroforética y su distribución regional. Las formas A y B son inactivadas, 91% y 10%, respectivamente por el tratamiento a 45°C durante 30 min.

La forma A es enormemente inactivada (77%) por remoción del PLP, mientras que la forma B es sólo ligeramente inactivada (7%). Estas dos formas pueden ser claramente separadas por electroforesis en 5% de gel de poliacrilamida, en la cual, la forma A migra más rápidamente que la forma B.

De diez regiones del cerebro estudiadas (locus coeruleus, cerebelo, hipocampo, cuerpo estriado, corteza visual, septo, sustancia negra, corteza olfatoria, hipotálamo y colículo superior), la forma A está presente en menores cantidades comparadas con la forma B. Estas diferencias son mayores en el colículo superior, mientras que en locus coeruleus y cerebelo, las formas A y B están presentes en proporciones aproximadamente iguales. En la TABLA 2 se muestran los resultados obtenidos en las diez regiones del cerebro estudiadas.

Estos resultados concuerdan bien con las dos formas de la GAD, propuestas a raíz de los trabajos de Tapia y cols., en estudios durante el desarrollo de la rata (1975, 1976).

TABLA 2. Distribución regional de las dos formas de la GAD.

Region	Actividad de la GAD (CPM/100mg peso húmedo)		
	Total	Forma A	Forma B
Locus ceruleus (7)	22355± 139	10183±1140	12172±1279
Cerebelo (4)	17720±1550	8040±1840	9680±3390
Hipocampo(4)	28620±3400	10090± 890	18530±4290
Cuerpo estriado(8)	22844± 734	7433± 252	15411± 986
Cort. visual (4)	33480±2800	10410±1003	23070±3803
Septum (8)	57058±2280	17589± 879	39469±3159
Sustancia negra (8)	42833±1841	13150±1170	29683±3011
Cort. olfatoria (7)	34267±2233	10222± 119	24045±2352
Hipotálamo (8)	36700±1798	10367± 750	26333±2548
colículo sup. (4)	66420±2040	14230±1260	52190±3300

Números en paréntesis son el número de determinaciones.

Tomada del artículo de Denner y Wu, 1985, página 963.

Estudios más recientes de biología molecular, en relación al análisis del tamaño del RNAm por geles de agarosa/formaldehído, han demostrado que durante el desarrollo se dan cambios cualitativos en el RNA mensajero de la GAD. En estados tempranos del desarrollo aparecen bandas del RNAm de mayor tamaño que corresponden al RNAm de estados posteriores del desarrollo (Bond y cols., 1988).

Aunque no se conoce el significado funcional de esto, propusieron tres posibilidades, durante el desarrollo: Un gen transcrito con una homología al gen de la GAD, También puede ser que el mismo gen se transcriba completamente incluyendo exones adicionales del mismo gen. Y finalmente esas bandas pueden representar un precursor de RNAm transcrito, en donde los intrones no han sido removidos.

II.4. Métodos de cuantificación de la GAD.

Uno de los pre-requisitos para el estudio de la actividad enzimática es que los métodos utilizados para su ensayo sean sensibles, simples, específicos y rápidos.

Existen varios métodos para la cuantificación de la GAD y estos se basan en medir la producción del GABA o de uno de los subproductos de la reacción, como sería el CO_2 . Los más comúnmente empleados son: el método de producción de $^{14}\text{CO}_2$, separación del GABA por columnas de afinidad, medición enzimática del GABA.

II.4.1. Método de producción de $^{14}\text{CO}_2$

El método del $^{14}\text{CO}_2$ fué primero descrito por Roberts y Frankel en 1951. Después éste fué remplazado por un método radiométrico más sensible y sencillo midiendo la formación de $^{14}\text{CO}_2$ formado a partir de su sustrato (L-glutamato). El $^{14}\text{CO}_2$ liberado durante la reacción es atrapado por soluciones alcalinas, tales como hidróxido de potasio, etanolamina, hidróxido de hyamina (Albers y Brady, 1959; Wu, 1976) o feniletilamina.

Este método tiene la ventaja de que es sencillo, y rápido para el ensayo de la GAD en el tejido nervioso. Y principalmente que es sensible y específico, ya que pueden emplearse cantidades muy pequeñas de tejido para la determinación de la actividad de la enzima (GAD).

Una de las serias limitantes del método es que el CO_2 liberado puede provenir de otras fuentes, dando como resultado una relación no estequiométrica entre el GABA y el CO_2 (Drummond y Phillips, 1974; Mac Donnel y Greengard, 1975; Wu, y cols., 1978a).

Otro problema de este método es que el L-glutamato obtenido de origen comercial contiene impurezas (Drummond y Phillips, 1974; Chude y Wu, 1976; Martin y Miller, 1976) el cual puede liberar $^{14}\text{CO}_2$ sin la simultánea formación de GABA.

II.4.2. Métodos de cuantificación del GABA.

II.4.2.1. Separación del GABA por columnas de afinidad.

a) Filtración rápida.

En 1976 Chude y Wu modificaron el método de Molinoff y Kravitz (1968) por combinación de filtración rápida al vacío y la selectividad de las resinas de intercambio iónico para el ensayo de muchas enzimas cuyo sustrato y producto difieren en su carga.

Esta técnica posee las siguientes ventajas:

1°) Es muy simple y rápida, permitiendo realizar hasta cien ensayos al día, además de que las mezclas de reacción pueden ser congeladas y ensayadas después.

2°) El glutamato marcado radiactivamente, con una muy alta actividad específica, puede ser un método sensible. Siendo el compuesto tritiado mucho más económico que el sustrato marcado con $[^{14}\text{C}]$.

3*) La resina y el sustrato usados en este método pueden ser regenerados y reutilizados.

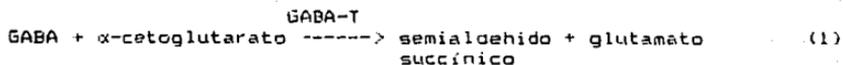
b) Columnas de intercambio iónico.

Este es un método enzimático llevado a cabo por Kravitz y cols. en 1965. La actividad de la glutamato descarboxilasa se mide por la recolección de $^{14}\text{CO}_2$, liberado del ^{14}C -glutamato, a partir de homogenado de tejido nervioso. Después de una hora de incubación a 25°C la reacción se detiene por calentamiento y la mezcla de reacción se coloca en una columna de Dowex-1-acetato. El producto es recuperado con lavados de agua.

II.4.2.2. Medición enzimática del GABA.

En todos los métodos de determinación del GABA pueden ser aplicados los ensayos para la GAD, así como se describe en el método enzimático para la determinación del GABA midiendo durante un minuto la actividad de la GAD (se utiliza menos de 0.1 μg de peso húmedo de tejido), (Okada y Shimada, 1976).

La actividad de la GAD es medida por la formación de GABA la cual se determina utilizando el sistema de la GABAasa (GABA-transaminasa y succinato semialdehído deshidrogenasa).



El NADPH⁺ formado se mide espectrofotométricamente.

SSDH: Semialdehído succínico deshidrogenasa

NADP⁺: Nicotín adenosín dinucleótido fosfato (oxidado)

NADPH: Nicotín adenosín dinucleótido fosfato (reducido)

II.6. Regiones del cerebro que participan en la actividad motora.

De acuerdo con lo observado anteriormente y en relación a los experimentos en animales de laboratorio, se decidió estudiar a la GAD en cuatro regiones del cerebro (corteza frontal, cerebelo, hipocampo y cuerpo estriado) que participan en la actividad motora. Figura 9.

En la corteza frontal se lleva a cabo un papel especial en las actividades motoras, en los atributos de juicio y previsión y para determinar el humor o "estado de animo".

En el cerebelo se recibe información de la mayoría de los sistemas sensitivos de la corteza cerebral y generalmente tiene influencia motora sobre la musculatura esquelética. La función del cerebelo es la de controlar el tono en relación con el equilibrio, la locomoción y la postura, así como la coordinación de la acción en movimientos estereotipados y no estereotipados.

El hipocampo Constituye una parte importante del sistema límbico, que está funcionalmente asociado con aspectos emocionales de la conducta relativos a la supervivencia del individuo y de la especie, junto con respuestas viscerales que acompañan a tales emociones y los mecanismos cerebrales para la memoria.

El cuerpo estriado participa en tres principales vías neuronales. Está formado de fibras que van del tálamo al neocestriado y del globus pallidus al núcleo rojo. Esta vía puede proporcionar actividad motora de tipo automático, incluyendo respuestas a cambios emocionales.

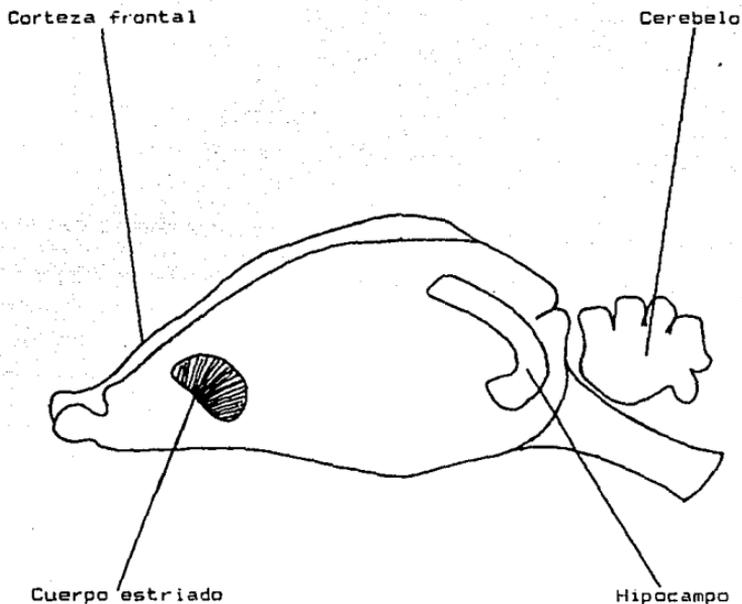


Figura 9. Representación esquemática de un corte sagital de cerebro de rata y la localización aproximada de corteza frontal, cerebelo, hipocampo y cuerpo estriado.

III. O B J E T I V O

Con estos antecedentes y tomando en cuenta la importancia de la actividad de la GAD para el control de la excitabilidad neuronal, el objetivo de la presente tesis es valorar la actividad de la enzima y determinar las diferencias en la activación por su coenzima, el PLP, en regiones del sistema nervioso central involucradas en la conducta motora (corteza frontal, cerebelo, hipocampo y cuerpo estriado) durante el desarrollo ontogénico de la rata.

IV. MATERIALES, REACTIVOS Y METODOS.

IV.1. Materiales para el método del $^{14}\text{CO}_2$.

Se utilizaron ratas Wistar de 2, 5, 10, 15, 25 y 90 días de edad.

El ácido glutámico y el PLP se obtuvieron de Sigma Chemical Co. El ^{14}C -glutamato fué obtenido de New England, el hidróxido de hyamina de Amersham y el resto de los reactivos de Merck.

IV.2. Método de producción de $^{14}\text{CO}_2$.

La actividad de la GAD se cuantificó utilizando el método radiométrico descrito previamente por Albers y Brady (1959) con algunas modificaciones.

Se utilizaron ratas de las edades mencionadas las cuales fueron sacrificadas por decapitación. Se obtuvo el cerebro y se realizaron las disecciones de las cuatro regiones (corteza frontal, cerebelo, hipocampo y cuerpo estriado) sobre una caja Petri en hielo. Las regiones se homogenizaron en buffer de fosfatos 50 mM pH 6.4 , al 20% (peso/volumen). De este homogenado, se tomaron alícuotas de 25 μl para cada ensayo de actividad de la GAD.

En tubos de vidrio pyrex de aproximadamente 200 μl de capacidad, se incubaron 25 μl del homogenado en presencia de 29 μl de buffer de fosfatos 10 mM pH 6.4; 8 μl de una mezcla de L-glutamato 10 mM y L- ^{14}C glutamato 0.05 μCi (concentraciones finales). Como parte del objetivo del trabajo es valorar la

activación de la GAD por el PLP, algunas condiciones se ensayaron en ausencia de PLP y otras en presencia de PLP 0.1 mM (concentración final).

Los tubos que contenían la mezcla de incubación, se conectaron por medio de mangueras de hule con tubos de vidrio pyrex del mismo volumen que contenían 50 μ l de hidróxido de hyamina, para permitir la difusión del $^{14}\text{CO}_2$ generado durante la reacción.

Los tubos se colocaron en gradillas de acrílico y se incubaron durante 20 minutos en un baño de agitación (American Optical, modelo 406015) a temperatura constante de 37°C.

La reacción se detuvo inyectando 100 μ l de ácido sulfúrico 2 N a través del tubo de hule con el fin de desnaturalizar la enzima.

Para permitir la total difusión del $^{14}\text{CO}_2$ hacia el tubo que contenía el hidróxido de hyamina, las muestras se mantuvieron en el baño de incubación durante una hora más.

Los tubos con el $^{14}\text{CO}_2$ atrapado se colocaron en viales con 10 ml del líquido de centelleo (Tritosol: 2,5- difeniloxazol PPO, Sigma Chemical Co., 9 g; etanol 96%, 318 ml; triton X-100, 771 ml; etilenglicol, 111 ml; xileno, 1800 ml, J.T. Baker). Se agitaron y se contaron en un contador de centelleo líquido (modelo Beckman LS 7500). Las muestras se procesaron por duplicado y se determinó la cantidad de proteína/ml contenida en el homogenado original. El método utilizado fue el de Lowry (1951), que es una modificación de la reacción de biuret con cobre (II) alcalino y la reacción de una sal compleja de molibdotungstato. llamado reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual da

un intenso color azul-verdoso con el complejo de biuret de residuos de tirosina y triptofano presentes en la proteína. El método proporciona una sensibilidad de aproximadamente 10-200 μg de proteína. Este es mucho más sensible que la reacción de biuret.

Los resultados del método del $^{14}\text{CO}_2$ se obtuvieron en cuentas por minuto (CPM) y para transformarlos se hicieron los siguientes cálculos:

A cada muestra se le resta el blanco y las CPM se transforman en desintegraciones por minuto (DPM) con la siguiente relación:

$$\text{DPM} = \text{CPM} / \% \text{ eficiencia de conteo} \times 100$$

Se realizó una curva con estándares sellados externos con el fin de conocer el % de eficiencia del contador de centelleo líquido utilizado.

Para determinar la actividad específica, se realizaron los siguientes cálculos:

1) 0.25 mCi ^{14}C -glutamato - 2.5 ml de solución

X mCi " - 1.0 ml X = 0.1 mCi

2) 0.1 mCi ^{14}C -glutamato - 1.0 ml

X mCi " - 0.0312 ml (de solución

en la mezcla radiactiva)

$$X = 0.00312 \text{ mCi } ^{14}\text{C}\text{-glutamato}$$

3) 3.12 μCi ^{14}C -glutamato - 500 μl (volumen final de la mezcla radiactiva)

X μCi " - 8 μl (alícuota en cada

tubito de reacción)

$$X = 0.049 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}\text{-glutamato (en cada tubito)}$$

4) Por cada tubito de reacción, se tienen 70 μ l de volumen total de la mezcla de incubación, en los cuales se encuentran 700 nmoles de ácido glutámico no marcado. Este dato nos es útil para determinar la actividad específica del glutamato radiactivo. La relación es la siguiente:

$$0.049 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C-glutamato} - 700 \text{ nmoles de glutamato no marcado}$$

5) 2.22×10^4 DPM - 1 μ Ci $^{14}\text{C-glutamato}$

$$X \text{ DPM} - 0.049 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C-glutamato}$$

$$X = 108.7 \times 10^3 \text{ DPM en } 700 \text{ nmoles de glutamato}$$

6) 108.7×10^3 DPM - 700 nmoles de glutamato

$$X \text{ DPM} - 1 \text{ nmol de glutamato}$$

$$X = 154 \text{ DPM están en } 1 \text{ nmol de glutamato.}$$

Entonces, tenemos que 154 DPM = 1nmol de glutamato, debido a que la reacción es estequiométrica, también corresponde a 1 nmol de GABA y a 1 nmol de CO_2 . De esta manera se obtienen los nmoles de CO_2 , que relacionados a la proteína. Y los resultados se pueden reportar en nmoles de CO_2 /mg de proteína/20 minutos.

Se calcularon los % de activación en presencia de PLP, se obtuvieron los promedios de todos los resultados y se reportaron con su respectivo error estándar.

En algunos casos se aplicó la prueba estadística "t" de Student, con el fin de valorar las diferencias estadísticamente significativas entre los 5, 15 y 90 días de edad.

V. RESULTADOS

a) Corteza frontal.

La tabla 3 resume los resultados obtenidos en corteza frontal en las diferentes edades estudiadas.

En la tabla se muestra el incremento de proteína a los 2, 5, 10, 15, 25 y 90 días de edad. Así mismo se presenta la actividad de la GAD en nmoles de CO_2 /mg de proteína/20 minutos en ausencia y presencia de PLP añadido in vitro, además del % de activación de la GAD por el PLP.

La actividad de la GAD en corteza frontal, se incrementó con respecto a la edad, siendo este incremento más importante en los primeros 15 días en los que se alcanzó la máxima actividad, tanto en los experimentos con PLP como en aquellos en que no se añadió la coenzima (Figura 10).

La figura 11 muestra el % de activación de la GAD por el PLP en corteza frontal a las edades mencionadas anteriormente.

Se observó que este % de activación es ligeramente mayor en edades tempranas, aunque las diferencias entre todas ellas no fueron estadísticamente significativas. El % de activación en esta región varió del 40% al 70%.

b) Cerebelo.

La tabla 4 muestra el resumen de datos experimentales obtenidos en cerebelo de ratas de diferentes edades. Al igual que en la tabla 3 se incluyen los resultados en mg de proteína determinado como promedio de 4 a 13 experimentos, el % de activación así como la actividad de la GAD en presencia de PLP y

en ausencia de PLP.

La figura 12 muestra el incremento de actividad de la GAD en función de la edad con y sin PLP. En ausencia de PLP, a 2 días se observó un aumento en la actividad de 17.8 nmoles de CO_2/mg proteína/20 minutos, y a 90 días 36.8 nmoles de CO_2/mg proteína/20 minutos y en presencia de PLP, a 2 días, de 32.6 nmoles de CO_2/mg proteína/20 minutos mientras que a los 90 días, 52.7 nmoles de CO_2/mg proteína/20 minutos.

El % de activación de la GAD resultó ser mayor a los 2 días, comparado con edades posteriores del desarrollo y la diferencia entre este porcentaje de activación a los 2 días y 90 días fué estadísticamente significativa (Figura 13).

c) Hipocampo.

La tabla 5 resume los resultados experimentales obtenidos en el hipocampo de ratas en desarrollo. En esta se observa el incremento esperado al contenido de proteína y la actividad de la GAD con respecto a la edad y se muestra el % de activación de la GAD por el PLP.

La actividad de la GAD sin PLP a los 2 y 5 días de edad es similar, 11.4 nmoles CO_2/mg proteína/20 min y 11.6 nmoles de CO_2/mg proteína/20 min. Y desde los 10 hasta los 90 días la actividad no varía notablemente, 25.5 a 34.3 nmoles CO_2/mg proteína/20 minutos (Figura 14).

El % de activación de la GAD debida al PLP fué mayor a los 5 días (84.7%) y menor a los 25 días (34.3%). Sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes edades (Figura 15).

d) Cuerpo estriado.

La tabla 6 muestra el resumen de los resultados obtenidos experimentalmente en cuerpo estriado, reportados de la misma manera que en las tablas anteriores.

Los mg de proteína en las diferentes edades se incrementaron durante el desarrollo de la rata, así como la actividad de la GAD con y sin PLP.

La actividad de la GAD en esta región, en ausencia de PLP, se incrementó con respecto a la edad. Este incremento va desde 11.4 nmoles de CO_2 /mg proteína/20 minutos en 2 días a 31.7 nmoles de CO_2 /mg proteína/20 minutos en 25 días.

En la presencia de PLP exógeno, la actividad de la GAD fué de 20.1 nmoles de CO_2 /mg proteína/20 minutos a los 2 días y de 50.5 nmoles de CO_2 /mg proteína/20 minutos a los 90 días (Figura 16).

En la figura 17 los % de activación de la GAD por PLP no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí de 2 a 10 días, pero sí pudieron ser observadas entre: los 15 y 25 días, los 15 y 90 días.

En esta región es en donde el % de activación fué mayor, comparado con las otras regiones.

TABLA 3. Corteza frontal.

Edad (días)	mg prot./25 μ l	Actividad de la GAD (nmol CO ₂ /mg prot./20 min)		% Activación de la GAD	N
		Sin PLP	Con PLP		
2	0.2358 \pm 0.01	13.4 \pm 1.5	22.1 \pm 2.2	69.2 \pm 9.0	11
5	0.2916 \pm 0.03	15.7 \pm 2.9	24.2 \pm 3.8	61.0 \pm 15.1	6
10	0.2455 \pm 0.01	30.9 \pm 2.5	45.5 \pm 3.9	49.8 \pm 8.0	20
15	0.4603 \pm 0.04	35.7 \pm 3.6	50.8 \pm 3.9	45.2 \pm 7.2	8
25	0.4718 \pm 0.03	27.6 \pm 3.0	38.9 \pm 4.4	40.8 \pm 5.4	7
90	0.4643 \pm 0.01	29.6 \pm 2.5	42.2 \pm 4.0	42.9 \pm 5.5	7

Valores promedio \pm Error estándar.

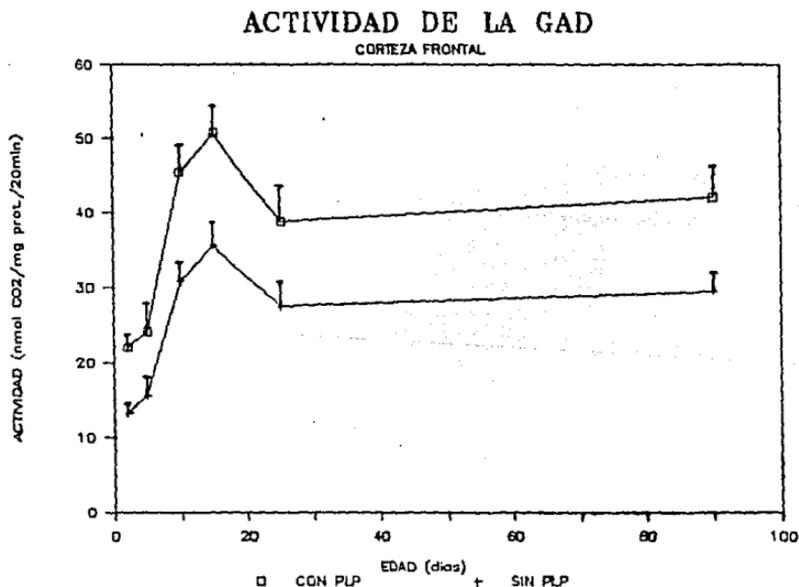


Figura 10. actividad de la GAD en corteza frontal en ausencia (+) y presencia (□) de PLP. Se muestra a diferentes edades del desarrollo en promedios de cada una de éstas \pm S.E.M.

% DE ACTIVACION DE GAD
CORTEZA FRONTAL

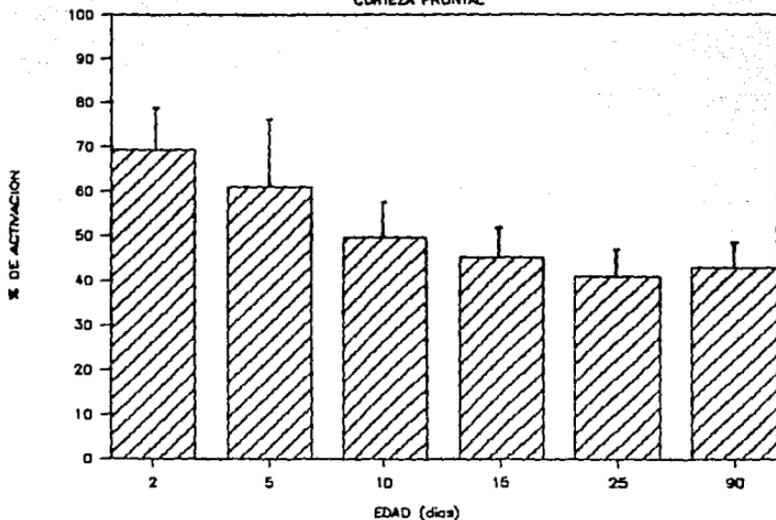


Figura 11. % de Activación de la GAD por PLP a diferentes edades. El PLP se añadió al ensayo *in vitro* y se consideró la actividad de la GAD sin PLP como el 100%. Se muestran los resultados de 6 experimentos a diferentes edades.

TABLA 4. Cerebelo.

Edad (días)	mg prot./25ul	Actividad de la GAD (nmol CO ₂ /mg prot./20 min)		% Activación de la GAD	N
		Sin PLP	Con PLP		
2	0.2034±0.01	17.8±2.3	32.6±3.9	85.3± 8.1	9
5	0.3083±0.03	21.3±2.2	32.3±3.6	50.2± 3.9	4
10	0.2584±0.02	28.7±3.9	48.6±6.2	73.8±11.7	13
15	0.3881±0.02	30.3±4.1	45.3±6.9	48.8± 4.7	8
25	0.4746±0.35	26.4±3.1	38.8±3.2	51.5±14.0	5
90	0.4550±0.01	36.8±7.2	52.7±9.9	43.0± 6.1	7

Valores ± Error estándar.*

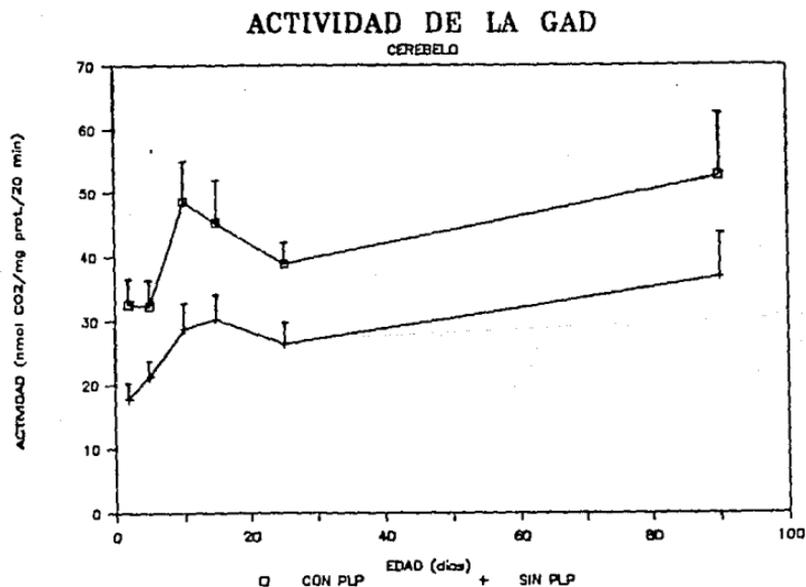


Figura 12. Actividad de la GAD expresado en nmoles de CO₂/mg de proteína/20 min., en ausencia (+) y presencia (□) de PLP, en cerebelo.

% DE ACTIVACION DE GAD

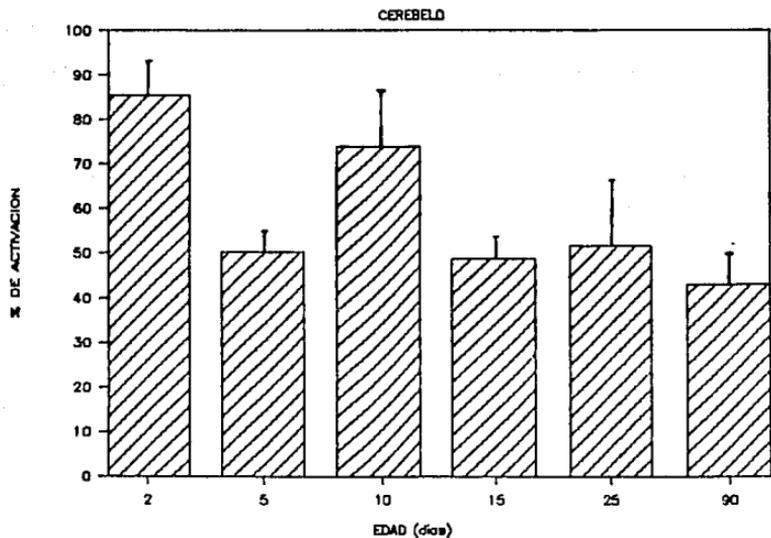


Figura 13. % de activación de la GAD por PLP en cerebello a diferentes edades.

TABLA 5. Hipocampo.

Edad (días)	mg prot./25µl	Actividad de la GAD (nmol CO ₂ /mg prot/20 min)		% Activación de la GAD	N
		Sin PLP	Con PLP		
2	0.1591±0.02	11.4±1.4	17.6±1.7	59.3±12.1	7
5	0.2181±0.01	11.6±1.8	20.8±2.4	84.7±17.5	5
10	0.2488±0.02	26.1±2.5	44.4±5.1	69.6±10.7	14
15	0.3381±0.01	25.5±2.5	41.6±4.3	63.8±12.1	9
25	0.4046±0.04	30.1±2.9	40.6±4.9	34.3± 7.2	6
90	0.4629±0.13	34.3±2.8	48.3±5.6	40.1±12.0	7

Valores promedio ± Error estándar.

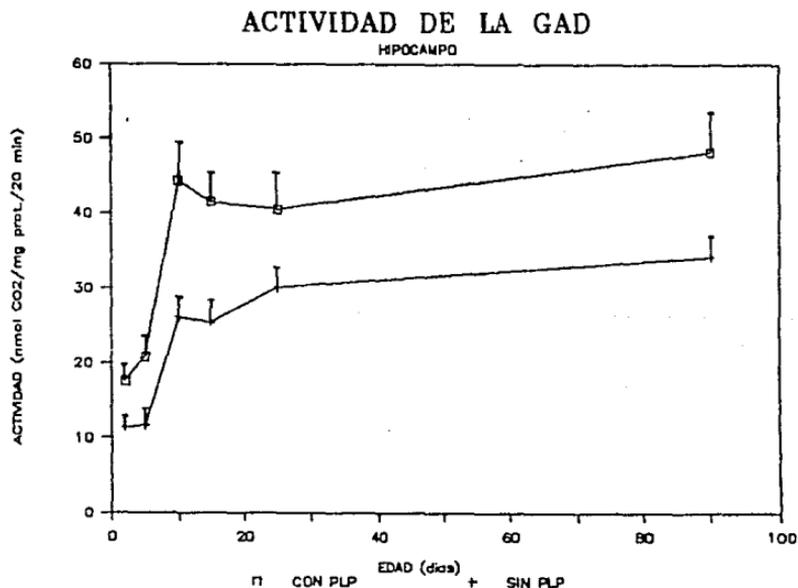


Figura 14. Actividad de la GAD en ausencia (+) y presencia (□) de PLP en hipocampo.

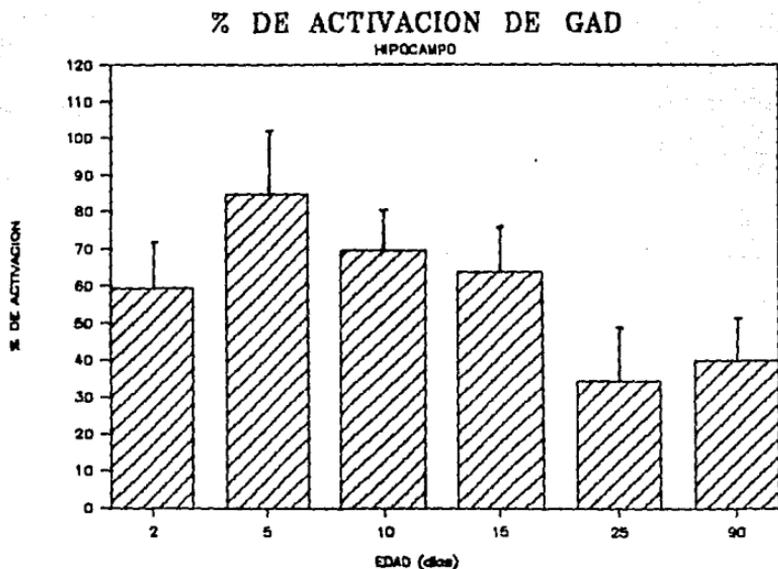


Figura 15. % de Activación de la GAD por PLP en hipocampo a diferentes edades.

TABLA 6. Cuerpo estriado.

Edad (días)	mg prot./25 μ l	Actividad de la GAD (nmol CO ₂ /mg prot/20 min)		% Activación de la GAD	N
		Sin PLP	Con PLP		
2	0.1278 \pm 0.01	11.4 \pm 2.0	20.1 \pm 4.4	72.4 \pm 14.4	6
5	0.1740 \pm 0.02	12.2 \pm 1.7	23.1 \pm 1.6	102.7 \pm 25.4	5
10	0.1900 \pm 0.02	21.6 \pm 2.9	38.9 \pm 4.8	98.7 \pm 25.3	14
15	0.2218 \pm 0.02	21.9 \pm 2.9	48.0 \pm 6.6	119.5 \pm 9.4	10
25	0.3316 \pm 0.03	31.7 \pm 2.1	45.8 \pm 3.9	45.1 \pm 9.8	6
90	0.4301 \pm 0.02	29.1 \pm 3.1	50.5 \pm 6.9	70.6 \pm 8.7	7

Valores promedio \pm Error estándar.

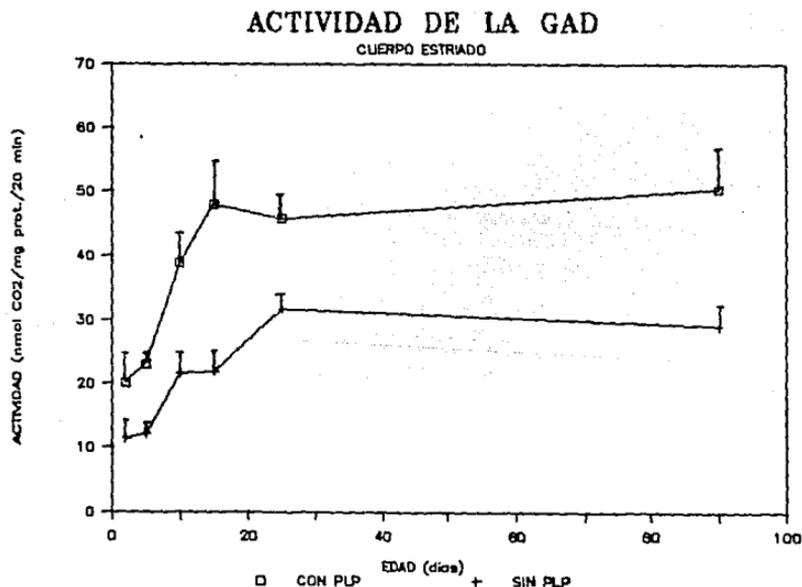


Figura 16. Actividad de la GAD expresada en nmoles de CO₂/mg de proteína/20 minutos, en cuerpo estriado.

% DE ACTIVACION DE GAD

CUERPO ESTRADO

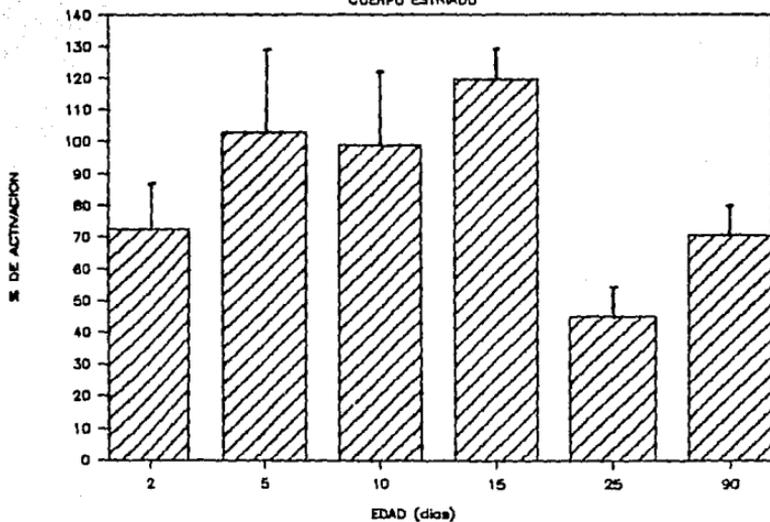


Figura 17. % de Activación de la GAD por PLP en cuerpo estriado en diferentes edades. * $P < 0.02$.

La tabla 7 resume los promedios de los % de activación de la GAD por PLP en las distintas regiones del cerebro y en las diferentes edades.

TABLA 7.

% de Activación de la GAD por PLP

Edad (días)	Corteza frontal	Cerebelo	Hipocampo	Estriado
2	69.2± 9.0	85.3± 8.1	59.3±12.1	72.4±14.4
5	61.0±15.1	50.2± 3.9	84.7±17.5	102.7±25.4
10	49.8± 8.0	73.8±11.7	69.6±10.7	98.7±25.3
15	45.2± 7.2	48.8± 4.7	63.8±12.1	119.5± 9.4
25	40.8± 5.4	51.5±14.0	34.3± 7.2	45.1± 9.8
90	42.9± 5.5	43.0± 6.1	40.1±12.0	70.6± 8.7

Valores promedio ± Error estándar.

VI. DISCUSION.

*Actividad regional de la GAD durante el desarrollo.

El incremento de la actividad de la GAD durante el desarrollo ha sido reportado por Sims y Pitts (1970). Al igual que ellos, encontramos un aumento de actividad con respecto a las etapas del desarrollo estudiadas y observamos en las cuatro regiones que para 10 y 15 días de edad se alcanzó un máximo de actividad comparado con los 2, 5 y 25 días.

Otros trabajos realizados en regiones del cerebro, muestran resultados similares. En corteza frontal, cerebelo, hipotálamo y estriado de ratas, en edades de 1 a 90 días de edad, el incremento en actividad de la GAD ($\mu\text{moles CO}_2/\text{g}$ de peso húmedo/hora) fué cualitativamente similar (Rothe y col., 1988).

De las cuatro regiones estudiadas en el presente trabajo, la que alcanza más rápido el máximo de actividad con respecto al desarrollo es la corteza frontal ($50.8 \text{ nmoles CO}_2/\text{mg}$ proteína/20 minutos en los 15 días de edad), seguida de cerebelo, estriado e hipocampo.

Aunque en las cuatro regiones estudiadas se observó el incremento de la actividad de la GAD con respecto al estado de maduración de los animales, fue notorio que en todas las regiones hubo una tendencia aparente a disminuir la actividad de esta enzima en la etapa adulta (90 días) con respecto a edades tempranas (10 a 15 días).

Lo anterior puede ser explicado por la manera de reportar la actividad de la GAD. Nuestros resultados han sido expresados en $\text{nmoles CO}_2/\text{mg}$ de proteína. La cuantificación de la proteína

en los homogenados crudos, es un buen parámetro, para expresar la actividad relativa de una enzima; sin embargo, cabe la posibilidad que en nuestro trabajo el incremento de la proteína con respecto a la edad no sea directamente proporcional al incremento de la actividad de la enzima (GAD). Esto podría explicar que en edades adultas, en que se alcanza una alta concentración de proteína en el homogenado de cada región cerebral, la actividad de la GAD puede aparentemente parecer menor que en edades más tempranas.

Sin embargo, no se puede descartar que esta aparente disminución de la actividad en etapas adultas comparadas con edades más tempranas del desarrollo pueda tener algún significado funcional.

*Activación de la GAD por PLP.

En cuanto a la activación por PLP es bien sabido que el papel de esta coenzima en la actividad de la GAD, es fundamental, ya que sin ella se modifica importantemente la producción de GABA.

Denner y Wu (1985), han reportado diferencias en la distribución regional de la activación por PLP en el cerebro de ratas adultas que los ha llevado a mencionar la existencia de dos formas de la GAD: la forma A independiente del PLP exógeno y la forma B, más dependiente. El cuerpo estriado y el hipocampo son regiones donde prevalece la forma B, mientras que en el cerebelo la proporción de ambas es similar.

En corteza frontal la activación es casi la misma a los 15, 25 y 90 días y ligeramente mayor a los 2, 5 y 10 días. Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas entre ellas. En cerebelo se encontró disminución de la activación por PLP a los 5 y 90 días. Estadísticamente solo hubo diferencias significativas entre los 2 y 90 días. Comparando estos resultados con los obtenidos en la corteza frontal, la activación se incrementó en los 2 y 10 días.

En hipocampo se observa que la activación de la GAD es mayor en etapas tempranas, aunque disminuye en etapas posteriores del desarrollo. Comparando las dos regiones anteriores con esta, se observó que en los 5 días la activación fue mayor en esta región, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada edad.

El cuerpo estriado fue la región donde más activación por PLP se encontró, ya que tanto en etapas tempranas como en las adultas del desarrollo la activación por la coenzima fue la más importante. Los resultados obtenidos en esta última región están de acuerdo con los reportados para ratas adultas por Denner y Wu (1985).

En homogenados de cerebro completo de ratas se han reportado con respecto a la activación de esta enzima que la GAD del recién nacido es menos activada por PLP que la enzima del adulto (Tapia y Meza-Ruiz, 1975;1976).

La existencia de dos formas de GAD con diferente sensibilidad para activarse por PLP, y una cierta distribución regional durante el desarrollo, no parece evidenciarse de manera

clara con los resultados obtenidos. Si bien, en hipocampo y cuerpo estriado, se observó cierta tendencia de mayor activación de la GAD por PLP.

Posiblemente una de las causas que no nos permitieron demostrar lo que ya ha sido reportado en animales adultos, con respecto a las dos formas de la GAD con diferente patrón de activación por PLP, fue metodológica.

En animales adultos ha sido claramente mostrado que existe una amplia concordancia entre la producción de $^{14}\text{CO}_2$ y la actividad de la GAD en cerebro, pues la cantidad de CO_2 producido es muy similar a la cantidad de GABA formado ($\text{GABA}/^{14}\text{CO}_2 = 1$). En homogenados de hígado (con actividad metabólica distinta a la de tejido cerebral), provenientes de rata adulta, la incubación con glutamato radiactivo, bajo condiciones óptimas para cuantificar actividad de la GAD, la producción de $^{14}\text{CO}_2$ es de 2 a 4 veces más alta que la formación de GABA (Wu y col., 1978). En experimentos realizados en nuestro laboratorio existen evidencias de que en homogenados de cerebro de ratas en desarrollo (particularmente de 2, 5 y 10 días de edad) la estequiometría $^{14}\text{CO}_2/\text{GABA}$ es mayor a 1 (Arias y cols., enviado a publicación), por lo tanto, durante el desarrollo es muy probable que la producción de $^{14}\text{CO}_2$ proveniente del ^{14}C -glutamato no se deba exclusivamente a la actividad de la GAD, pues como se sabe el $^{14}\text{CO}_2$ puede ser originado por la descarboxilación oxidativa del α -cetoglutarato, el cual a su vez puede derivar, por transaminación o por oxidación, del glutamato.

De esta manera parece ser que el método de cuantificación del $^{14}\text{CO}_2$ puede no reflejar estrictamente la actividad de la GAD durante los primeros 10 días del desarrollo.

En animales de 15 días de edad en adelante, parece existir una buena correlación estequiométrica como la reportada para animales adultos en trabajos previos (Arias y cols., enviado a publicación; Drumond y Phyllips, 1974).

Sin embargo, y pese a la anterior limitación metodológica, fue posible observar en nuestros datos una clara tendencia a una mayor activación de la GAD por el PLP, que resulta estadísticamente significativo en el cuerpo estriado, con respecto a las demás regiones estudiadas. La existencia de una forma de GAD con mayor dependencia para activarse por su coenzima y con cierta distribución en regiones del S.N.C., pueden hacer pensar que los cambios en la disponibilidad del PLP afectarán de manera más importante la actividad de la GAD en estas regiones y con los consecuentes cambios conductuales asociados a la pérdida del control inhibitorio.

VII. CONCLUSIONES.

1. El aumento de actividad de la GAD durante el desarrollo de la rata varía en las distintas regiones estudiadas.
2. La activación por el PLP parece ser mas importante en el hipocampo y en el cuerpo estriado durante el desarrollo ontogénico de la rata.
3. Es necesario considerar que la producción de $^{14}\text{CO}_2$ puede no guardar una relación estequiométrica con la producción del GABA en etapas tempranas del desarrollo.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- Albers, R.W., and Brady, R.D. (1959) The distribution of glutamic acid decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* **234**: 926-928
- Arias, A. Clorinda: Tesis de maestria. Interacciones iónicas con la membrana sinaptosomal y su relación con la liberación de neurotransmisores. México, 1985. U.N.A.M.
- Arias, C., Valero, H., and Tapia, R. (1990) Inhibition of brain glutamate decarboxylase activity is related to febrile seizures in rat pups (enviado a publicación).
- Barr, M.L. (1975) El sistema nervioso humano; 2a. Edición. Editorial HARLA. pp.10, 12, 14 y 18.
- Baxter, C. F. (1976) Some recent advances in studies of GABA metabolism and compartmentation GABA in nervous system function (Roberts, E., Chase, T.N., y Tower, D.B., eds) Raven Press, New York, Vol. 5, pp.61-87.
- Bayón, A. , Possani, L. D. , y Tapia, R. (1977) Kinetics of brain glutamate decarboxilase. Inhibition studies with N-(5'-phosphopiridoxyl) amino acids. *J. Neurochem.* **29**: 513-517.
- Bazemore. A. Elliot, K. A. C., y Florey, E. (1956) Factor I and GABA. *Nature*, **178**: 1052-1053.
- Bessman, S. R., Rossen, J., y Layne, E. C. (1953) GABA transamination in brain. *J. Biol. Chem.* **201**: 385-391.
- Bond, W.R., Jansen, K.R., y Gottlieb, D.I. (1988) Pattern of expression of glutamic acid decarboxylase mRNA in the developing rat brain. *Neurobiol.* **85**: 3231-3234.

- Brainard, J. R., Kyner, E., y Rosenberg, G. A. (1989) ¹³C Nuclear magnetic resonance evidence for γ -aminobutyric acid formation via pyruvate carboxylase in rat brain: A metabolic basis for compartmentation. *J. Neurochem.* 53: 1205-1292.
- Brandon, C., Lam, D.M.K., y Wu, J.-Y. (1979) The γ -aminobutyric acid system in rabbit retina: Localization by immunocytochemistry and autoradiography. *Proc. Natl. Acad. USA.* 76: 3557-3561.
- Brandon, C. (1986) Purification of L-glutamato decarboxylase from rabbit brain and preparation of a monospecific antiserum. *J. Neurosci. Res.* 15: 367-381.
- Chan-Palay, V., Wu, J.-Y., y Palay, S.L. (1979b) Immunocytochemical localization of γ -aminobutyric acid transaminase at cellular and ultrastructural levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 2067-2071.
- Chude, D., y Wu, J.-Y. (1976) A rapid method for assaying enzymes whose substrates and products differ by charge application to brain L-glutamate decarboxylase. *J. Neurochem.* 27: 85-86.
- Dakshinamurti, K., y Stephens, M. C. (1969) Piridoxine deficiency in the neonatal rat. *J. Neurochem.* 16: 1515-1522.
- Denner, L. A., y Wu, J.-Y. (1985) Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate. *J. Neurochem.* 44: 957-965.

- Drummond, R. J., y Phillips, A.T. (1974) L-Glutamic acid decarboxylase in non-neural tissues of the mouse. *J. Neurochem.* 23: 1207-1213.
- Florey, E. (1954) Inhibitory and excitatory factor of mammalian central nervous system and their action on single sensory neurons. *Arch. Intern. Physiol.* 62: 33-53.
- Goodman Gilman, Alfred y Goodman Louis, S. (1986) Las bases farmacológicas de la terapéutica. Séptima Edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 89.
- Holtz, P., y Palm, D. (1964) Pharmacological aspects of vitamin B₆, *Pharmacol. Rev.* 16: 113-178.
- Kandel, Eric R., y Schwartz, James H. (1981) Principles of Neural Science. Edit. El Sevier/North-Holland. pp.5.
- Knight, M., Ebert, J., Parish, R.A., Berry, H., y Fogelson, H. (1985) Aminobutyric acid in CSF of children with febrile seizures. *Arch. Neurol.* 42 : 474-475.
- Kravitz, E.A., Molinoff, P.B., y Hall, Z.W. (1965) A Comparison of the enzymes and substrates of gamma-aminobutyric acid metabolism in lobster excitatory and inhibitory axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 54: 778-782.
- Kuriyama, K., Siskin, T. Haber, B., y Roberts, E. (1963) The γ -aminobutyric acid system in rabbit retina. *Brain Res.* 9: 165-168.
- Leech, A. R.; Neusholme, E. A., *Bioquímica médica.* Editorial Interamericana, 1987. pp.647.

- Loscher, W. (1979) 3 Mercaptopropionic acid: convulsant properties, effects of enzymes of the γ -aminobutyrate system in mouse brain and antagonism by certain anticonvulsant drugs, aminooxyacetic acid and gabaculine. *Biochem. Pharmacol.* 28: 1397-1407.
- Loscher, W., Rating, W., y Sieves, H. (1981) GABA in cerebrospinal fluid of children with febrile convulsions *Epilepsia.* 22: 679-702.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A., y Randall, R.J. (1951) Protein measurement, with the folin phenol reagent. *J. Biol.Chem.* 193: 265-275.
- Mac Donnel, P., y Greengard, O. (1975) The distribution of glutamate decarboxylase in rat tissues: Isotopic vs fluorimetric assays. *J. Neurochem.* 24: 615-618.
- Martin, D.L., y Miller, L.P. (1976) Comment on the evidence for GAD II. In *GABA in nervous system function* (E. Roberts, T.N. Chase, y D.B. Tower, eds.) Raven Press, New York, pp. 57-58.
- Martin, D.L., Meeley, M.p., Martin. S.B., y Pedersen, S. (1980) Factors influencing the activation and inactivation of glutamate decarboxylase. *Brain Res. Bull*5: (suppl.2), 57-61.
- Matsuda, T., Wu, J.-Y., and Roberts, E. (1973a) Immunochemical studies on glutamic acid decarboxylase (EC 4.1.1.15) from mouse brain. *J. Neurochem.* 21: 159-166.

- Matsuda, T., Wu, J.-Y., y Roberts, E. (1973b) Electrophoresis of glutamic acid decarboxylase (EC 4.1.1.15) from mouse brain in studium dodecil sulphate polyacrylamide gels. J. Neurochem. 21: 167-172.
- Meldrum, B.S., Horton, R.W., y Sawaya, M.C.B. (1975) The convulsant action of methylthiocarbamate : a comparison with other sulphur containing hidrazides. J. Neurochem. 24: 1003-1009.
- Molinoff, P.B., y Kravitz, E.A. (1968) The Metabolism of γ -aminobutyric acid (GABA) in the lobster nervous system- glutamic decarboxylase. J. Neurochem. 15: 391-409.
- Nitsch, C. (1980) Regulation of GABA metabolism in discrete rabbit brain regions under methoxypyridoxine -Regional differences in cofactor saturation and the preictal activation of glutamate decarboxylase activity. J. Neurochem. 34: 822-830.
- Oertel, W.H., Toppaz, M.L., Kopin, I.J., Ransom, D.H., y Schmechel, D.E., (1980). Production of an antiserum to rat brain glutamate(GAD)/ cysteine sulfinat (CSD) decarboxylase in GABA neurotransmission: Current developments in physiology and neurochem.(Harbans, Lal Ed) Ankho Internat. Inc. Brain Res.Bull. 5: (Suppl.2) pp.713-719.
- Okada, Y., y Shimada, C. (1976) Intrahippocampal distribution of GABA and GAD activity in the Guinea Pig: Microassay method for the determination of GAD activity. In GABA in nervous system function. (Roberts,E., Chase, T.N., y Tower, D.B., eds) Raven Press, New York. pp.223.

- Pérez de la Mora, M., Possani, L.D., Tapia, R., Terán, L., Palacios, R., Fuxe, K., Hökfelt, T., y Ljungdahl, A., (1981) Demonstration of central γ -aminobutyrate-containing nerve terminals by means of antibodies against glutamate decarboxylase. *Neurosci.* 6: 875-895.
- Rawn, D.J. (1989) *Biochemistry*. Neil Patterson Publishers. Carolina Biological Supply Company. pp. 458-461.
- Roberts, E., y Kuriyama, K. (1968) Biochemical-physiological correlation in studies of the γ -aminobutyric acid system. *Brain Res.* 8: 1-35.
- Rothe, T., Middleton-Price, H., y Bigl, V. (1988) The ontogeny of GABA receptors and glutamic acid decarboxylase in regions of the rat brain. *Neuropharmacol.* 27: No. 7: pp. 661-667.
- Saito, K., Barber, R., Wu, J.-Y., Matsuda, T., Roberts, E., y Vaughn, J.E. (1974a) Immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase in rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 269- 273.
- Schausboe, A., Wu, J.-Y., y Roberts, E. (1974) Subunit structure and kinetic properties of 4-Aminobutyrate 2-ketoglutarate transaminase purified from mouse brain. *J. Neurochem.* 23: 1189-1195.
- Seiler, N., A-Therib, M.J., y Kataoka, K. (1973) Formation of GABA from putrescine in the brain of fish (*Salmoirideus gibb*) *J. Neurochem.* 20: 699-708.
- Sims, K.L., Pitts, F.N., (1970) Brain glutamate decarboxylase: Changes in the developing rat brain. *J. Neurochem.* 17: 1607-1612.

- Snyder, S.H. (1975) GABA in nervous system function an overview, in the nervous system. Vol. I. The Basic Neurosciences (Tower, D. B., ed.) pp. 355-361. Raven Press, New York.
- Stryer, L. (1968) Biochemistry, 3a. Edition, W.H. Freeman and Company/New York. pp. 500.
- Su, Y.Y.T., Wu, J.-Y., y Lam, D.M.K. (1979) Purification of L-glutamic acid decarboxylase from catfish brain. J. Neurochem. 33: 169-179.
- Tapia, R., y Sandoval, M.E., (1971) Study on the inhibition of brain glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate oxime-o-acetic acid. J. Neurochem. 18: 2051-2059.
- Tapia, R., Pasantes-Morales, H., Taboarda, H., y Perez de la Mora, M. (1975a) Seizures susceptibility in the developing mouse and its relationship to glutamate decarboxylase and pyridoxal phosphate in brain. J. Neurobiol. 6: 159-170.
- Tapia, R. Sandoval, M.E., y Contreras, P. (1975b) Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. J. Neurochem. 24: 1283-1285.
- Tapia, R., y Meza Ruiz, G. (1975) Differences in some properties of newborn and adult brain glutamate decarboxylase. J. Neurobiol. 6: 171-181.
- Tapia, R., y Meza Ruiz, G. (1976) Changes in some properties of glutamate decarboxylase activity during the maturation of the brain. Neurochem. Res. 1: 133-140.
- Tapia, R. (1983) γ -aminobutyric Acid Metabolism and Biochemistry of Synaptic Transmission in Handbook of Neurochemistry (Lajtha, A. Ed) Vol.3, 2a. Edition. Plenum Press, New York.

- Tapia, R. (1983). El ácido γ -aminobutírico en Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas (Pasantes Morales, H. y Aréchiga, H.) Biblioteca de Ciencias. U.N.A.M. pp. 57-60.
- Tower, D.B., (1976) GABA and seizures: Clinical correlates in man in GABA in nervous system function (Roberts, E., Chase, T.N., y Tower, D.B., eds) Raven press, New York, pp. 461-478.
- Willis, William D. Jr., Grossman Roberts G(1981), Medical Neurobiology. Neuroanatomical and neurophysiological principles basic to neuroscience. Third edition. Editorial The C.V. Mosby Company, pp. 1-2.
- Wu, J.-Y., Matsuda, T., y Roberts, E. (1973) Purification and characterization of glutamate decarboxylase from mouse brain J. Biol. Chem. **248**: 3029-3034.
- Wu, J.-Y., y Roberts, E. (1974) Properties of brain L-glutamate decarboxylase: Inhibition studies. J. Neurochem. **23**: 759-767.
- Wu, J.-Y. (1976) Purification and properties of L-glutamate decarboxylase (GAD) and GABA-aminotransferase (GABA-T) in GABA in nervous system function (Roberts, E., Chase, T., y Tower, D., eds) Raven . Press New York. Vol. 5, pp. 7-55.
- Wu, J.-Y., Chude, O., Wein, J., Roberts, E., Saito, K., y Wong, E. (1978a) Distribution and tissue specificity of glutamate decarboxylase (EC 4.1.1.15) J. Neurochem. **30**: 849-857.