

03062

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**

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



**ANÁLISIS INMUNOCITOQUÍMICO DE LAS DOS FORMAS DE LA  
GLUTAMATO DESCARBOXILASA (GAD<sub>65</sub> Y GAD<sub>67</sub>) Y DE LA PROTEÍNA  
C-FOS DURANTE EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA AL GABA (SAG)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

**(ÁREA NEUROCIENCIAS)**

**P R E S E N T A:**

**LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D.F. 1995**

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

11  
209

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**

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

**ANALISIS INMUNOCITOQUIMICO DE LAS DOS FORMAS DE LA  
GLUTAMATO DESCARBOXILASA (GAD 65 Y GAD 67) Y DE LA PROTEINA  
C-FOS DURANTE EL SINDROME DE ABSTINENCIA AL GABA (SAG)**

**PRESENTA**

**BIOL. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. SIMON BRAILOWSKY K.**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO D.F. 1995**

**Este trabajo fué realizado en el laboratorio de Neurofarmacología del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Simón Brailowsky K.**



**Esta tesis la dedicó con mucho amor para:**

**“José Alberto”**

**El hijo que sentó en mi vientre,  
que espero con gran ilusión,  
y que quiero.**

## **AGRADECIMIENTOS**

---

**A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial al Instituto de Fisiología Celular por haberme brindado la oportunidad de realizar uno de mis sueños: prepararme y ser mejor.**

**A la Universidad de Guadalajara por haberme apoyado en esta parte de mi formación académica.**

**Al Dr. Simón Brailowsky por todo su apoyo y consideración, así como sus enseñanzas que me permitieron mejorar en todos los sentidos.**

**A los miembros del jurado por sus comentarios y sugerencias.**

**A Tere Montiel por toda su paciencia, ayuda y comprensión. Por ser la gran amiga.**

**A mis padres: Lupita y Alfredo, por haberme brindado a lo largo de toda mi vida, un gran amor, apoyo y comprensión. Por ser el ejemplo a seguir y por que los quiero.**

**A mis hermanos: Yadira Elizabeth y José Alfredo, por brindarme momentos felices y ser mis mejores amigos.**

**A mi esposo Alberto por su cariño y comprensión, en los momentos difíciles de mi vida.**

**A todos mis amigos que encontré en México... por su apoyo e interés. Por hacerme la vida más agradable.**

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AMPA	D,L- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (Acido 3-amino-4-hidroxi-5-metil-isoxasol propiónico)
APH	Acido fosfonoaminoheptanoico
APP	Pro-proteína amiloide
APV	2-amino-5-fosfonovalerato
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor (Factor neurotrófico derivado del cerebro)
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CCK	Colecistoquinina
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
CRE	Cyclic AMP-responsive element (Elemento responsivo a Ca <sup>2+</sup> )
CREB	Cyclic AMP-responsive element binding protein (Proteína de unión al elemento responsivo a cAMP)
CT	Tomografía computarizada
DAB	Diaminobencidina
DNA	Acido desoxirribonucleico
EEG	Electroencefalograma
GABA	Acido $\gamma$ -aminobutírico
GABAA	Receptor a GABA tipo A
GABAB	Receptor a GABA tipo B
GABA-T	4-aminobutirato-2-oxoglutarato amino transferasa; EC 2.6.1.19 (GABA transaminasa)
GAD	L-glutamato-1-carboxilasa, EC 4.1.1.15 (glutamato descarboxilasa)
GEPR	Ratas con predisposición genética a la epilepsia generalizada

GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GTP	Guanosina trifosfato
HEPP	Hidroxí-etil-propionamida
IB con	Células corticales con capacidad intrínseca de generar PDSs estimulación sináptica e inyección de corriente intracelular
IEG	Genes tempranos inmediatos
ILAE	Assembly of the International League Against Epilepsy (Liga Internacional de lucha contra la Epilepsia)
IPSP	Potencial postsináptico inhibitorio
IR	Inmunoreactividad
KA	Acido kaínico
KPBS	Amortiguador de fosfatos de potasio salino
LTP	Potenciación de largo plazo
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MRI	Imágenes de resonancia magnética
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
NB	Células corticales que no presentan actividad con estimulación sináptica o inyección de corriente intracelular
NCAM	Moléculas de adhesión celular neural
NGF	Nerve Growth Factor (Factor de crecimiento nervioso)
NGS	Suero normal de cabra
NHS	Suero normal de caballo
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPY	Neuropéptido Y
6-OHDA	6-hidroxidopamina
PB	Amortiguador de fosfatos de sodio
PBS	Amortiguador de fosfatos de sodio salino
PBSGT	PBS con suero normal de conejo o cabra y tritón
PDS	Deflexión despolarizante paroxística
PET	Tomografía de emisión de positrones
PLP	Fosfato de piridoxal
PPE	Pre-proencefalina

PTZ	Pentilentetrazol
SAG	Síndrome de Abstinencia al GABA
SB	Células corticales con capacidad para generar PDSs con estimulación sináptica
SNC	Sistema Nervioso Central
SSADH	Deshidrogenasa de semialdehído succínico
TEA	Tetraetilamonio
TH	Tirosina-hidroxilasa
THIP	4,5,6,7-tetrahidroisoxazol-piridinol
VIP	Polipéptido intestinal vasoactivo

# INDICE

---

CONTENIDO	PAGINA
I. INTRODUCCION	1
1. La Epilepsia	1
2. Modelos animales de las Epilepsias	7
3. Neurotransmisión GABAérgica	9
3.1. La Glutamato Descarboxilasa (GAD)	12
A) Regulación de la GAD	15
B) Distribución de la GAD	18
C) Relación de la GAD con diferentes tipos de patologías	18
3.2. Receptores	20
3.2.1. Receptores GABA A	20
A) Estructura y regulación	21
B) Distribución	22
C) Relación del receptor con diferentes afecciones	24
3.2.2. Receptores GABA B	24
3.3. GABA y Epilepsia	26
4. El Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG)	28
4.1. El SAG en la rata	30
4.2. Inducción del SAG	30
4.3. Patrones EEG del SAG	31
4.4. Cambios que se presentan durante el SAG	35
4.5. Farmacología del SAG	37
5. Proto-oncogenes en el Sistema Nervioso Central	39
5.1. C-fos	40
5.2. C-fos y Epilepsia	44

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	47
III. OBJETIVOS	48
IV. MATERIALES Y METODOS	49
V. RESULTADOS	56
1. Registro electroencefalográfico (EEG) del SAG	56
2. Expresión de c-fos	56
A) Controles de la técnica	56
B) Grupos tratados	57
C) Correlación EEG	61
3. Expresión de las GADs	61
A) GAD 67	61
B) GAD 65	61
4. Expresión de GFAP	69
VI. DISCUSION	73
VII. CONCLUSIONES	87
VIII. REFERENCIAS	88

# INTRODUCCION

---

## 1. LA EPILEPSIA

La epilepsia es un síntoma de disfunción cerebral, de carácter recurrente, que se caracteriza por la descarga sostenida y anormalmente sincrónica de un grupo de neuronas cerebrales. Las crisis epilépticas pueden presentarse como una complicación de accidentes infecciosos, traumáticos, tumorales, de alteraciones sistémicas, desórdenes metabólicos, toxicidad por fármacos o de síndromes hereditarios.

La epilepsia es un desorden neuropsiquiátrico con una prevalencia e incidencia anual muy alta. De acuerdo a estudios epidemiológicos de varios países, el rango de prevalencia e incidencia se encuentra entre 0.15 a 1.95% y de 0.02 a 0.05%, respectivamente. Los avances tecnológicos recientes como, la tomografía computarizada (CT), las imágenes de resonancia magnética (MRI) y la tomografía de emisión de positrones (PET), combinados con el monitoreo en video y electroencefalográfico (EEG), han permitido la detección de las posibles causas de las crisis, la identificación del foco epileptogénico sin la necesidad de métodos invasivos, una distinción entre las crisis epilépticas y no epilépticas y, entre varios tipos de crisis epilépticas, para el mejoramiento del tratamiento (Zielinski, 1988).

La clasificación de la epilepsia es compleja y se puede basar en la etiología, la patología, la edad de inicio, las crisis clínicas, los hallazgos EEG o el pronóstico. Una clasificación de los tipos de crisis individuales fue la aceptada en 1981 por la General Assembly of the International League Against Epilepsy (ILAE) y ha sido ampliamente utilizada en el manejo de la epilepsia. Sin embargo, esta clasificación no refleja el síndrome epiléptico tan complicado que incluye el tipo de crisis, la etiología, la anatomía, los factores precipitantes, la edad de inicio, los ciclos circádicos y a veces el pronóstico; por lo que en 1989 se presentó una nueva clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos por la ILAE (tabla 1). Las divisiones principales se basan en la localización de las crisis, si es



generalizada, si se presenta una etiología conocida, si no se presenta o se desconoce: sintomática, idiopática o criptogénica. La clasificación de 1981 se considera pragmática para uso clínico pero no así para los especialistas en la epilepsia; además, se le considera una herramienta de gran utilidad para guiar las decisiones acerca del tratamiento de la epilepsia.

**TABLA 1. CLASIFICACION INTERNACIONAL DE LAS EPILEPSIAS Y SINDROMES EPILEPTICOS (1989)**

- 
- I. Relacionada con la localización (focal, local, parcial) epilepsias y síndromes
- A. Idiopática (relacionada con la edad de inicio)
    - 1. Epilepsia infantil benigna con espigas centrotemporales
    - 2. Epilepsia infantil con paroxismos occipitales
    - 3. Epilepsia primaria
  - B. Sintomática
    - 1. Epilepsia parcial progresiva crónica continua (síndrome de Kojewnikow)
    - 2. Síndromes caracterizados por crisis con modos específicos de precipitación
    - 3. Epilepsias del lóbulo temporal
    - 4. Epilepsias del lóbulo frontal
    - 5. Epilepsias del lóbulo parietal
    - 6. Epilepsias del lóbulo occipital
  - C. Criptogénicas
- II. Epilepsias generalizadas y síndromes
- A. Idiopáticas (relacionadas con la edad de inicio)
    - 1. Convulsiones neonatales benignas familiares
    - 2. Convulsiones neonatales benignas
    - 3. Epilepsia mioclónica benigna en la infancia
    - 4. Epilepsia de ausencia infantil (piknolepsia)
    - 5. Epilepsia de ausencia juvenil
    - 6. Epilepsia mioclónica juvenil (petit mal impulsivo)

7. Epilepsia tipo gran mal, crisis en vigilia
8. Otras epilepsias idiopáticas generalizadas no definidas arriba
9. Epilepsias con crisis precipitadas por modos específicos de

activación

#### B. Criptogénicas o sintomáticas (de acuerdo a la edad)

1. Síndrome de West (espasmos infantiles, Blitz-Nick-Salaam
2. Síndrome de Lennox-Gastaut
3. Epilepsia con crisis mioclónicas-estáticas
4. Epilepsia con ausencias mioclónicas

Krämpfe)

#### C. Sintomáticas

1. Etiología no específica
  - a. Encefalopatía mioclónica temprana
  - b. Encefalopatía epiléptica infantil temprana con supresión
  - c. Otras epilepsias generalizadas sintomáticas no definidas

abrupta

arriba

2. Síndromes específicos

### III. Epilepsias y síndromes no determinados focales o generalizados

#### A. Con crisis focales y generalizadas

1. Crisis neonatales
2. Epilepsia mioclónica severa en la infancia
3. Epilepsia con espigas-ondas continuas durante el sueño de ondas
4. Afasia epiléptica adquirida (síndrome de Landau-Kleffner)
5. Otras epilepsias no definidas arriba

lentas

#### B. Sin características inequívocas generalizadas o focales

### IV. Síndromes especiales

#### A. Crisis relacionadas a la situación (Gelegenheitsanfälle)

1. Convulsiones febriles
2. Crisis aisladas o status epilepticus aislado

3. Crisis que ocurren solo cuando existe un evento metabólico o tóxico debido a factores como el alcohol, las drogas, la hiperglicemia no-cetónica, etc.

---

Modificada de la Comisión de Clasificación y Terminología de la ILAE (1989)

Las evidencias clínicas y EEG muestran que las crisis parciales derivan de estructuras del cerebro unilaterales; se dividen en tres tipos, de acuerdo a la preservación de la conciencia y si las crisis son generalizadas o no. Las crisis parciales simples no deterioran la conciencia y los síntomas frecuentemente reflejan la región en la cual las descargas se originan. Los signos y síntomas son del tipo motor, sensorial, cognitivo y/o psíquico. En las crisis parciales complejas se deteriora la conciencia y se caracterizan por automatismos donde el individuo retiene el control de la postura y el tono muscular pero realiza movimientos simples o complejos y acciones sin control voluntario. Finalmente, las crisis parciales simples frecuentemente se acompañan de crisis parciales complejas o secundariamente generalizadas.

Dentro de las crisis generalizadas, las crisis de ausencias se caracterizan por lapsos cortos de inconciencia que duran segundos a minutos, sin deterioro de las funciones cognitivas. Las crisis mioclónicas son sincrónicas bilateralmente, se presentan en varios desórdenes que incluyen, degeneración cerebral progresiva, anoxia cerebral e intoxicación por drogas que causan estas crisis. Las crisis clónicas se observan cuando una crisis tónico-clónica carece de su fase tónica, mientras que las crisis tónicas representan una contracción simétrica tónica de los músculos. Las crisis tónico-clónicas se observan en las crisis generalizadas y en las secundariamente generalizadas. Estas crisis se caracterizan por pérdida de la conciencia y desvanecimiento. Finalmente, las crisis atónicas se caracterizan por la pérdida abrupta del tono muscular: el paciente frecuentemente sufre caídas.

Entre otros tipos de crisis se encuentran, la epilepsia parcial benigna con espigas centro-temporales, las crisis neonatales, las convulsiones febriles y la epilepsia refleja. Por otro lado, el status epilepticus consiste en crisis recurrentes sin la recuperación de la conciencia entre los ataques. Existen tres tipos conocidos:

el status convulsivo, causado principalmente por el retiro abrupto de drogas antiepilépticas en pacientes tratados, el status no convulsivo que consiste en un estado de crisis generalizadas no convulsivas (ausencia) y crisis parciales complejas. Finalmente, las crisis parciales continuas que incluye cualquier forma del estado parcial simple; la más común es la conocida como síndrome de Kojewnikow (Fukuzako y Izumi, 1991).

Las opciones que se tienen para el tratamiento de las epilepsias incluyen la dieta, las terapias conductuales, la cirugía y los medicamentos. Estos últimos han tenido un gran éxito, ya que los fármacos anticonvulsivantes son efectivos en la mayoría de las personas con esta afección. Los primeros de ellos en la medicina de la era moderna fueron las sales de bromuro y el magnesio (Friedlander, 1986; Locock, 1857; Mayer y col., 1984). Posteriormente, los barbitúricos y las hidantoinas, presentaron efectos anticonvulsivantes aunque con cierta toxicidad y efectos no deseables. Las benzodiazepinas y el ácido valproico se consideran buenos anticonvulsivantes en todos los tipos de epilepsia, con ciertos efectos de sedación y cambios psíquicos (Meldrum y Champman, 1986).

Desde el punto de vista de la neurotransmisión sináptica, la epilepsia ha sido considerada tanto como un trastorno de la inhibición (por deficiencia), como de la excitación (por exceso); la complejidad de la epilepsia incluye ambos sistemas. A nivel de los neurotransmisores inhibidores, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es uno de los principales en el fenómeno paroxístico; la disminución de este aminoácido a nivel de los receptores o de su síntesis se halla asociada a la presencia de focos epileptogénicos o a convulsiones. Asimismo, la mayoría de los fármacos que aumentan la concentración de GABA en el sistema nervioso central (SNC) presentan propiedades anticonvulsivantes (Lloyd y col., 1986; Olsen y col., 1985).

Con respecto a los neurotransmisores excitadores el glutamato y/o aspartato, actúan sobre diferentes receptores específicos y parecen ejercer un papel importante sobre la excitabilidad neuronal. Estos compuestos ejercen la transmisión excitatoria rápida en el SNC en condiciones normales y patológicas como la epilepsia (Engelsen, 1986; Fagg y Foster, 1983; Fonnum, 1984). Estos

neurotransmisores se les ha relacionado con los mecanismos de iniciación y propagación de las crisis convulsivas (Faingold y col., 1992; Geddes y col., 1990; Piredda y Gale, 1986).

La participación del glutamato en la epilepsia puede considerarse desde dos puntos de vista: la producción de crisis por glutamato o bien la de glutamato por crisis. Al respecto de la primera, existe evidencia de que la activación de receptores a los aminoácidos excitadores (receptor N-metil-D-aspartato, NMDA) en el SNC pueden promover o inducir crisis convulsivas. De este modo la administración de glutamato o de agonistas a estos compuestos en ciertas áreas del cerebro tienen propiedades convulsivantes (Croucher y Bradford, 1989), mientras que los antagonistas de éstos presentan perfiles anticonvulsivantes (Croucher y col., 1982). En consideración de la producción de glutamato por crisis, se ha demostrado niveles altos de glutamato en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con epilepsia generalizada primaria (Janjua y col., 1989; Kalviainen y col., 1993). Asimismo, se ha encontrado un aumento dramático en los niveles de glutamato en el foco epiléptico de pacientes durante las crisis a través de microdialisis intracerebral (During y Spencer, 1993). Los estudios de liberación en diferentes modelos de epilepsia han mostrado aumentos, alteraciones muy leves y en algunos casos resultados paradójicos, sin embargo, parece ser que la participación del glutamato en los procesos convulsivos es de particular importancia.

Otra parte importante del fenómeno epiléptico lo constituye la glía, con la regulación de la homeostasis iónica a nivel extracelular; se le considera un factor de control de la propagación y extinción de la actividad paroxística.

**TABLA 2. FARMACOS DE USO PARA LA EPILEPSIA (LISTA DE AGENTES SECUNDARIOS EN PARENTESIS)**

Epilepsia parcial simple y compleja	Epilepsia tipo Ausencia
- Carbamazepina	- Etosuximida
- Fenitoína	- Acido valproico
- (Acido valpróico)	- (Parametadione)
- (Fenobarbital)	- (Trimetadione)
- (Primidona)	- (Acetazolamida)

### Epilepsia generalizada tónico-clónica

- Acido valpróico
- Fenobarbital
- (Primidona)
- (Carbamazepina)
- (Fenitoína)

### Epilepsia Mioclónica

- Acido Valpróico
- Clonazepam

### Epilepsia Secundariamente generalizada tónica-clónica

- Carbamazepina
- Fenitoína
- Acido valproico
- Fenobarbital
- (Primidona)

Tomada de: Fisher, R. S. 1991

## 2. MODELOS ANIMALES DE LAS EPILEPSIAS

La mayoría del conocimiento acerca de los mecanismos del fenómeno epiléptico y de la terapia con fármacos anticonvulsivantes ha sido obtenido a través del estudio de modelos animales de epilepsia (Dichter, 1989); cada uno de estos modelos presenta algunas de las manifestaciones de la epilepsia humana. En el caso de las epilepsias focales, la gran mayoría de los modelos experimentales utiliza la aplicación localizada de sustancias convulsivantes en la corteza cerebral o sistema límbico, tanto in vivo como in vitro (Turski y col., 1983; Yamamoto, 1972). La utilización de electroshock directo en la neocorteza o lesiones producidas por nitrógeno líquido congelado, también inducen crisis parciales. El modelo del kindling de amígdala e hipocampo se ha empleado para generar crisis parciales complejas con gran éxito (Gloor y Olivier, 1982). Para el caso de las epilepsias generalizadas, los modelos más utilizados son: el electroshock máximo (aplicación de trenes de corriente de 0.2-1 segundo de duración), la aplicación sistémica de convulsivantes (como el pentilentetrazol, la picrotoxina, la bicuculina y el ácido kaínico) y los modelos con predisposición genética a las crisis, como los monos fotosensibles *Papio papio*, los ratones con crisis audiogénicas de la cepa DBA/2J, las ratas con predisposición genética GEPR (Generalized epilepsy prone rats) y el modelo de crisis generalizadas recurrentes no convulsivas GAERS (Genetic absence epileptic rat from Strasbourg) (Gloor y Olivier, 1982; Killam y col., 1967; Krauss y col., 1989; Lothman y col., 1981;

Marescaux y col., 1992; Porter y Martin, 1984; Reigel y col., 1986; Swinyard, 1972; Taylor-Couval y Gloor, 1984).

### **TABLA 3. MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA**

---

#### **1. EPILEPSIA PARCIAL O FOCAL**

##### **1.1. SIMPLE**

- Aplicación tópica de convulsivantes
- Postdescargas focales (Electroshock directo)
- Congelación focal
- Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG)

##### **1.2. COMPLEJA**

- Kindling
- Acido kaínico
- Toxina tetánica
- In vitro: rebanadas de cerebro

#### **2. EPILEPSIA GENERALIZADA**

##### **2.1 TONICO-CLONICAS**

- Electroshock máximo
- aplicación sistémica de convulsivantes (estimulantes de la excitación o bloqueadores de la inhibición)
- Crisis fotosensibles en monos
- Roedores con predisposición genética

##### **2.2. TIPO AUSENCIA**

- Modelos genéticos en roedores
- Penicilina sistémica
- THIP
- Gama-hidroxitubirato

---

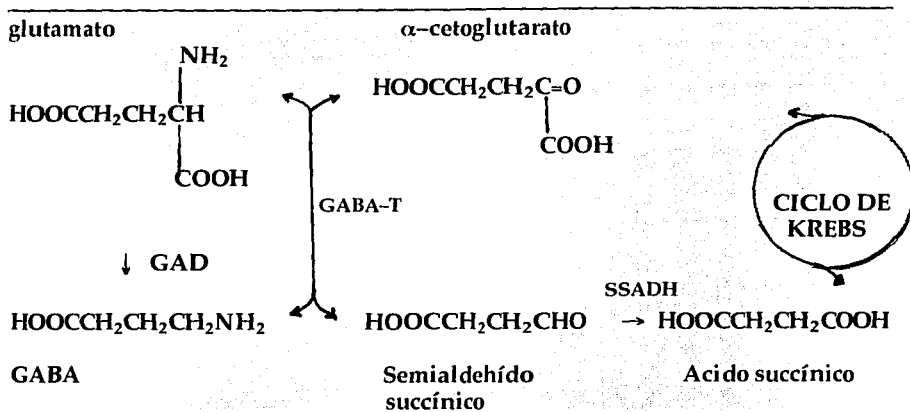
Tomada de Fisher, R. S., 1991

### 3. NEUROTRANSMISION GABAERGICA

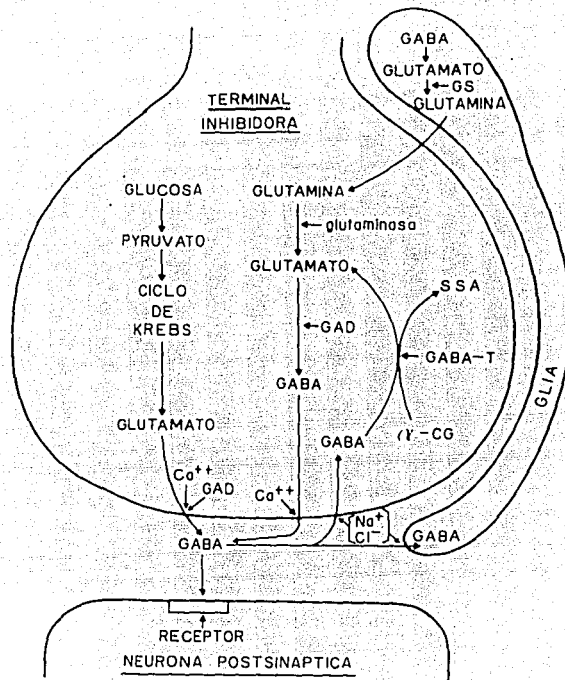
El GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) es el principal neurotransmisor inhibitorio del Sistema Nervioso Central (SNC). En el cerebro adulto, se sintetiza a partir de la descarboxilasa del ac. glutámico (L-glutamato-1-carboxilasa, CAD; EC 4.1.1.15), la cual remueve el grupo  $\alpha$ -carboxilo del glutamato para producir GABA y  $\text{CO}_2$ . La CAD requiere fosfato de piridoxal como cofactor y su reacción es irreversible bajo condiciones fisiológicas. El GABA puede ser sintetizado por algunas otras vías, como la ornitina y la putrescina (Caron y col., 1987; Daune y Seiler, 1988), sin embargo, estas vías no parecen contribuir significativamente a la síntesis de GABA en el adulto.

La degradación metabólica del GABA se lleva a cabo mediante la actividad de la transaminasa del GABA (4-aminobutirato-2-oxoglutarato amino transferasa, GABA-T; EC 2.6.1.19). Esta enzima, que también requiere fosfato de piridoxal como cofactor, cataliza la transferencia del grupo amino del GABA al ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, dando como productos el semialdehído succínico y el ácido glutámico. El semialdehído succínico posteriormente es oxidado a ácido succínico por la deshidrogenasa del semialdehído succínico (SSADH); esta vía metabólica constituye un corto circuito en el ciclo de Krebs. La GABA-T ha sido purificada del cerebro de varias especies, tiene un peso molecular de aproximadamente 109,000 D. y se localiza fundamentalmente en las mitocondrias; se conoce poco acerca de los mecanismos que regulan su actividad y se clonó recientemente (Medina-Kauwe y col., 1994).





Existe cierta compartimentalización en el metabolismo del GABA. Existe un depósito pequeño de ácido glutámico localizada en la astrogía y un depósito grande en las terminales nerviosas, que es el sitio de síntesis del GABA. El GABA es liberado de la terminal nerviosa donde posteriormente es removido y captado por la glía donde es transaminado por la GABA-T. El glutamato formado en esta reacción es utilizado por la glutamino-sintetasa para formar glutamina, la cual es transportada a las terminales sinápticas en donde mediante la acción de la glutaminasa, sirve como precursor del depósito grande de glutamato, que a su vez es descarboxilado por la GAD para producir GABA. Existe evidencia experimental de que la glutamina es un buen precursor del depósito liberable de GABA, tanto in vitro como in vivo, aunque se ha demostrado que el GABA sintetizado a partir de otros compuestos como la glucosa y el piruvato, también es liberado por estimulación (Tapia, 1991).



**FIGURA 1.** Esquema neuroquímico del funcionamiento de las sinapsis GABAérgicas. El GABA se sintetiza a partir de la GAD, que puede estar soluble en el citoplasma de la terminal y alimentar una poza de GABA, que es liberado por un mecanismo dependiente de  $Ca^{2+}$ . Otra población de GAD puede unirse a la membrana presináptica, unión que depende de la presencia de  $Ca^{2+}$  o  $K^+$ , de esta manera la liberación del GABA esta acoplada a su síntesis. El GABA liberado puede ser recapturado por la terminal o la glia por un transporte activo que depende de  $Na^+$  y  $Cl^-$ , para ser metabolizado por una reacción de transaminación con  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -CG) catalizada por la GABA-transaminasa (GABA-T). En la reacción se forman semialdehído succínico (SSA) y glutamato, el cual puede en la glia utilizarse para formar glutamina, precursora del glutamato en la terminal. Tomado de Tapia, R. 1991.

### 3.1. LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA: GAD

El cerebro contiene al menos dos formas de la enzima que son productos de genes diferentes (Erlander y col., 1991): la GAD<sub>67</sub> que presenta 593 aminoácidos con un peso molecular de 66,600 D. y la GAD<sub>65</sub> que contiene 585 aminoácidos y un peso molecular de 65,400 D., las secuencias de aminoácidos de estas dos formas son idénticas en un 65% (Bu y col., 1992); estas dos formas difieren en secuencia, antigenicidad, localización subcelular, expresión regional e interacción con el fosfato de piridoxal (Bu y col., 1992; Kaufman y col., 1991). El gen que codifica la GAD<sub>67</sub> presenta un sitio promotor (P1) en el cerebro adulto y un segundo (P2) en el cerebro fetal. El sitio promotor P1 se asemeja a los promotores de muchos genes que se expresan constitutivamente, mientras que el P2 se asemeja a los promotores que son específicos del tejido (Erlander y Tobin, 1992). La GAD<sub>65</sub> se localiza en el cromosoma humano 10p11.23 y la GAD<sub>67</sub> en el cromosoma humano 2q31; ambas se encuentran en el SNC y cada una es capaz de sintetizar activamente GABA (Bu et al., 1992).

**TABLA 4. CARACTERISTICAS DE LAS DOS FORMAS DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA (GAD)**

#### GAD<sub>65</sub>:

- Apoenzima
- Regulación es dependiente de PLP
- Estudios que no detectan cambios o ligeras alteraciones en el mRNA
- Se localiza en el cromosoma 10 p 11.23
- Se encuentra en terminales más que en somas (síntesis lenta o transporte axonal rápido de los somas a las terminales)
- Función: poza de reserva en la terminal; se convierte en holoenzima cuando se requiere mayor síntesis de GABA
- En células beta pancreáticas se encuentra en tres formas: soluble hidrofílica→soluble hidrofóbica→hidrofóbica unida a membranas.
- La proteína requiere los residuos de aminoácidos 24-31 para unirse a la

membrana

- La proteína se une a microvesículas en células beta del páncreas y a vesículas sinápticas en las neuronas GABAérgicas
- Candidato de autoantígeno en la diabetes mellitus dependiente de insulina

### GAD<sub>67</sub>:

- Holoenzima
  - Independiente de PLP
  - Regulación a nivel transcripcional (mRNA): Estudios que demuestran cambios rápidos en los niveles de mRNA en respuesta a varias lesiones y manipulaciones farmacológicas
    - Se localiza en el cromosoma 2 q 31
    - Se encuentra en somas y dendritas más que en terminales (síntesis muy alta)
  - Función: probablemente es la forma predominante en neuronas que presentan patrones de disparo tónico o represente una poza metabólico de GABA
  - Candidato de autoantígeno en la diabetes mellitus dependiente de insulina
- 

La GAD<sub>65</sub> es más sensible a la presencia de fosfato de piridoxal exógeno que la GAD<sub>67</sub>, además que la mayor parte de la apo-GAD se presenta en la forma de GAD<sub>65</sub> (Kaufman y col., 1991; Martin y col., 1991b). Las cantidades relativas de GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub> no pueden ser exactamente determinadas por mediciones sencillas de la actividad de la GAD en presencia y ausencia de fosfato de piridoxal, debido a que ambas formas se presentan in vivo como apoGAD y ambas se activan al adicionar fosfato de piridoxal, aunque el efecto sobre la GAD<sub>67</sub> es menor (Erlander y Tobin, 1991; Kaufman y col., 1991; Martin y col., 1991a; Martin y col., 1991b).

hGAD65	MASIPGSGFWSFGSEDCSGDSENPGTARA WCQVAQKFTGCGIGNKLCALLYGDAEKP AESCG	60
rGAD65	<sup>P</sup> <sup>S</sup>	
hGAD65	SQPPRAAARKAAACACDQKPCSCSKVDVNYAFLHATDLLPACDGERPTIAFLQDVMNILLQ	120
rGAD65	VTS T V T P G L E	
hGAD65	YVVKSFDRSTKVIDFHYPNELLQEYNWELADQIQNLEEILMHCQTTLKYAIKTGHIPRYFN	180
rGAD65	T	
hGAD65	QLSTGLDMVGLAADWLTSTANTNMFTYEIAPV FV LLEVTVLKKMREIIGWPGCSGDCGIFS	240
rGAD65		
hGAD65	PGGAISNMYAMMIARFKMFPPEVKEKGM AALPRLIAFTSEHSHFSLKKGAAA LGIGTDSVI	300
rGAD65	L Y V	
hGAD65	LIKCDERCKMIPSDLERRILEAKQKGFV PFLV SATACTTVYGAFDPLLA VADICKKYKIW	360
rGAD65	V	
hGAD65	MHVDA AWGGLLMSRKHKWLKSGVERANSVTWNPHKMMCGVPLQCSALLVREELMQNCNQ	420
rGAD65	N S	
hGAD65	MHASYL FQQDKHYDLSYDTGDKALQCGRHVDVFKLWLMWRAKGTTCFEAHVDKCLELAEY	480
rGAD65	I	
hGAD65	LYNIIKNREGYEMVFDCKPQHTNVCFWYIPPSLR TLEDNEERMSRLSKVAPVIKARMM EY	540
rGAD65	FV V	
hGAD65	GTTMVSYQPLGDKVNFRRMVISNPAATHQDIDFLIEIERLGQDL	585
rGAD65		
hGAD67	MASSTPSSSA TSSNAGADPN TTNLRPTTYDTWCCVAHGCTRKLGLKICGFLQRTNSLEEK	60
rGAD67	P	
hGAD67	SRLVSAFRERQSSKNLLSCENS DRDARFRRTETDFS NLFARDLLPAKNGEEQTVQFLLEV	120
rGAD67	A P G Q	
hGAD67	VDILLNYVRKTFDRSTKVLDFHHPHQ LLECMEGFNLELDHPESLEQILVDCRDTLKYGV	180
rGAD67		
hGAD67	RTGHPRFFNQLSTGLDIIGLAGEWLTSTANTNMFTYEIAPV FV LMEQITLKKMREIVGWS	240
rGAD67	I	
hGAD67	SKDGDGIFSPGGAISNMYSIMAARYKYFPPEVKTGMAAVPKLV LFTSEQSHYSIKKAGAA	300
rGAD67	N H	
hGAD67	LGFGTDNVILKNERGKIIPADFEAKILEAKQKGYV P FV V N A T A C T T V Y G A F D P I Q E I A	360
rGAD67	L D F L	
hGAD67	DICEKYNLWLHVDA AWGGLLMSRKHRRHKLNGIERANSVTWNPHKMMCGVLLQCSAILVKE	420
rGAD67	S	
hGAD67	KGILUCCNQMCA GYLFQPDKQYDVSYDTGD AIQCGRHVDIFKFWLMWKAKGT VGFENQI	480
rGAD67		
hGAD67	NKCLELAEYLYAKIKNREEFEMVFN GEP EHTNVCFWYIPQSLRGVPDSPQRREKLHKVAP	540
rGAD67	E R	
hGAD67	KIKALMMESGTTMVG YQPQGDKANPFRMVISNPAATQSDIDFLIEIERLGQDL	594
rGAD67		

**FIGURA 2.** Las secuencias de aminoácidos de la GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub> humana. El sitio de unión al fosfato de piridoxal está delineado. Los aminoácidos de la GAD<sub>67</sub> de rata que difieren de la GAD<sub>67</sub> humana, al igual que para la GAD<sub>65</sub> se presentan por debajo de las secuencias humanas. Secuencias tomadas de Bu, D.-F. y col. 1992.

**TABLA 5. COMPARACION INTER-ESPECIE DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEOTIDOS Y AMINOACIDOS DE LA GAD.**

	IDENTIDAD DE LA SECUENCIA (nucleótidos/aminoácidos), %				
	GAD <sub>65</sub> HUMANA	GAD <sub>67</sub> HUMANA	GAD <sub>65</sub> RATA	GAD <sub>67</sub> RATA	GAD <sub>67</sub> FELINA
GAD <sub>65</sub> HUMANA		63/65	89/96	63/66	64/66
GAD <sub>67</sub> HUMANA			63/65	91/97	93/98
GAD <sub>65</sub> RATA				63/65	65/66
GAD <sub>67</sub> RATA					90/97

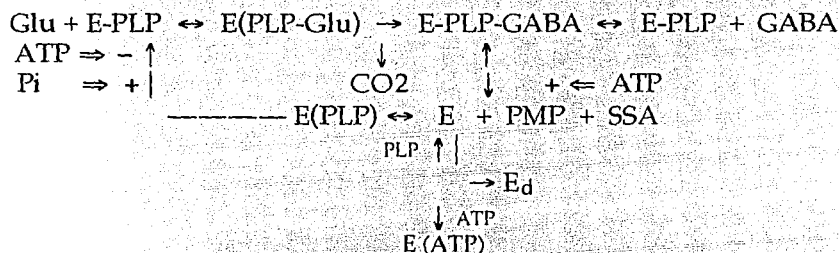
La comparación de la secuencia nucleotídica se limita a las regiones codificadas de los cDNAs de la GAD (Bu y col., 1992; Erlander y col., 1991; Kobayashi y col., 1987; Wyborski y col., 1990).

#### A) REGULACION DE LA GAD

La expresión de los dos genes de la GAD y consecuentemente la actividad y función de las dos proteínas, parecen ser reguladas por diferentes mecanismos (Erlander y col., 1991; Kaufman y col., 1991; Martin, 1993). La regulación de la GAD<sub>65</sub> se encuentra a nivel de su interacción con el cofactor ya que es dependiente de éste; por su parte, la GAD<sub>67</sub> tiene una regulación a nivel transcripcional. Se ha reportado que tanto el mRNA como la proteína de ambas formas de la GAD se expresan de manera paralela en la mayoría de las neuronas GABAérgicas. La GAD<sub>65</sub> concentrada en las terminales (por presentar síntesis muy lenta o un transporte rápido de la enzima de los somas a las terminales) se le considera una poza de la GAD en los sitios sinápticos, que pudiera convertirse de apoenzima en holoenzima cuando la demanda de síntesis de GABA lo requiera; por el contrario, la GAD<sub>67</sub> concentrada en los somas (por una síntesis muy alta) pudiera ser representativa de las neuronas con patrones de disparo tónico o asociada a una poza metabólica de GABA (Esclapez y col., 1994).

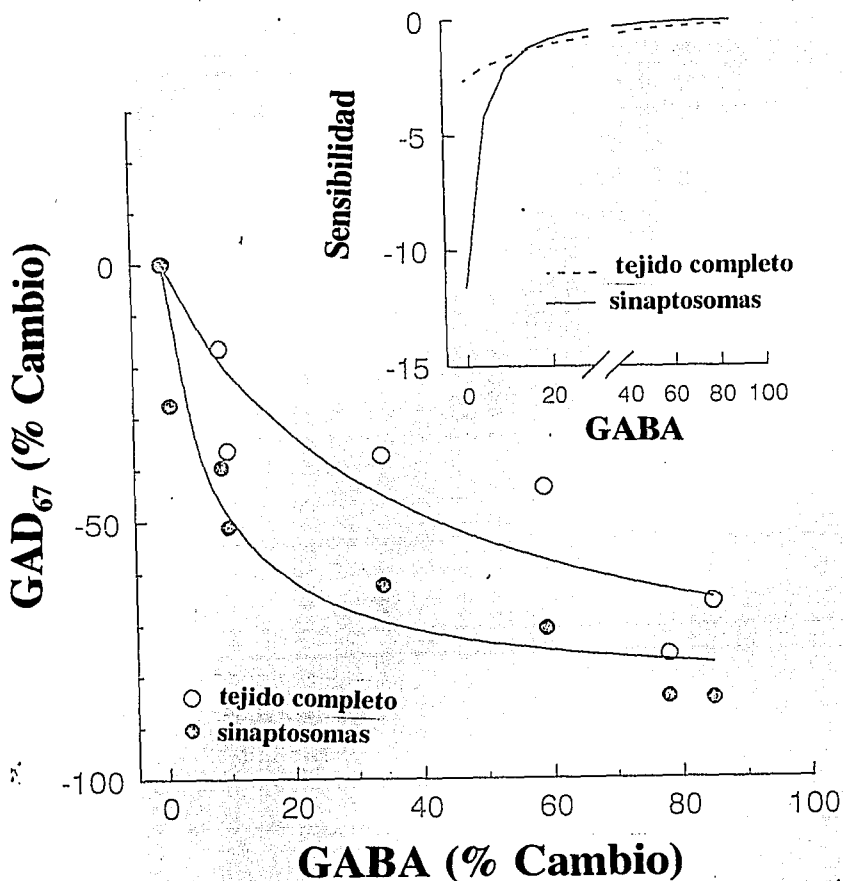
Al menos el 50% de la GAD se presenta en el cerebro como apoenzima; holo y apo-GAD se interconvierten por un ciclo de reacciones que forman parte

del mecanismo catalítico normal de la GAD, el cual se ve altamente regulado por concentraciones fisiológicas de polianiones como el ATP y el fosfato inorgánico (Porter y Martin, 1984). El glutamato, el GABA y el aspartato permiten la formación de apo-GAD a través de la reacción de transaminación alternativa en este ciclo, mientras que el ATP y otros polianiones inhiben la activación de la apo-GAD y la estabilizan contra la desnaturalización térmica. El hecho de que el ATP y el fosfato inorgánico regulen esta interconversión sugiere que la actividad de la GAD esta relacionada con el metabolismo energético (Martin y Rimvall, 1993).



**FIGURA 3.** El mecanismo de reacción de la GAD que incluye la interconversión de holo- y apo-GAD, y los efectos de ATP y Pi. ATP, adenosina trifosfato; Pi, fósforo inorgánico; PLP, fosfato de piridoxal; E-PLP, holo-GAD; E, apo-GAD; PMP, fosfato de piridoxamina; SSA, semialdehido succinico; E<sub>D</sub>, GAD desnaturalizada. Tomado de Martin, D. L., 1993.

Estudios recientes reportan que la proteína GAD<sub>67</sub> es altamente sensible a los efectos del GABA: 1% de aumento en el nivel del GABA en la terminal nerviosa reduce la proteína GAD<sub>67</sub> cerca del 12%, por lo que la regulación de la expresión de la GAD<sub>67</sub> por el GABA es fisiológicamente significativa (Rimvall y Martin, 1994).



**FIGURA 4.** Cambios en el tejido completo y sinaptosomal de los niveles de la GAD<sub>67</sub> como una función del cambio porcentual en los niveles de GABA en la terminal nerviosa. Las curvas se obtuvieron de acuerdo a la ecuación 1 de esta referencia (Rimvall, K. y Martin, D. L., 1994). Recuadro: la sensibilidad de los cambios de la GAD<sub>67</sub> en el nivel del GABA, como una función del cambio porcentual en los niveles del GABA sinaptosomal. Las curvas fueron calculadas con la ecuación 2 de la referencia.



## B) DISTRIBUCION DE LA GAD

Técnicas de inmunocitoquímica con anticuerpos que distinguen entre las dos formas de la GAD (Chang y Gottlieb, 1988; Oertel y col., 1981) y de hibridación in situ, han demostrado una amplia distribución de estas formas de la enzima a nivel del SNC y periférico (Feldblum y col., 1993; Mercugliano y col., 1992; Moffett y col., 1994). El mRNA de la GAD<sub>65</sub> predomina en los sistemas visual y neuroendócrino, como las regiones del núcleo geniculado lateral, colículo superior, el núcleo pretectal olivario y los núcleos pontino e hipotalámicos, los cuales están sujetos a cambios fásicos; mientras que la GAD<sub>67</sub> se presenta en muchas neuronas de activación tónica, como en la región de la neocorteza, capa granular del bulbo olfatorio, septum lateral y medio, globo pálido, colículo inferior y la corteza cerebelar (Feldblum y col., 1993); a nivel periférico, se les ha localizado en el oviducto y el testículo (Tillakaratne y col., 1992). Durante el desarrollo del SNC, la expresión de la GAD<sub>67</sub> aumenta a nivel de cerebelo y la GAD<sub>65</sub> aumenta a nivel de la médula espinal (Behar y col., 1993; Greif y col., 1991; Ma y col., 1994).

## C) RELACION DE LA GAD CON DIFERENTES TIPOS DE PATOLOGIAS

Varios estudios han demostrado cambios rápidos en los niveles del mRNA para la GAD<sub>67</sub> en respuesta a varias lesiones y manipulaciones farmacológicas (Kincaid y col., 1992; Mercugliano y col., 1992; Obenaus y col., 1993; Saji y col., 1994; Segovia y col., 1990); en contraste, hay pocos estudios que hayan examinado los niveles de mRNA para GAD<sub>65</sub>, en los que se ha encontrado ligeras alteraciones o ningún cambio (Soghomonian y Chesselet, 1992). Se ha observado que en el estriado, la inyección neonatal de 6-OHDA (100 y 150 mg) aumenta los niveles del transcrito de GAD<sub>67</sub> al compararse con los controles. Esta lesión bilateral en ratas neonatales, es capaz de inducir una alteración de largo término y ampliamente distribuida en la expresión del gen que codifica a la GAD<sub>67</sub> (Soghomonian, 1992). Resultados similares se observan en el globo pálido de ratas inyectadas en el estado adulto con 6-OHDA y durante el síndrome

epiléptico crónico después de la aplicación de toxina tetánica a nivel intrahipocampal (Najlerahim y col., 1992). Existen trabajos que han demostrado un aumento del mRNA para la GAD<sub>67</sub> en el estriado y el globo pálido en monos tratados con MPTP y de la GAD<sub>65</sub> a nivel del putamen, lo que sugiere un papel importante de esta enzima en la regulación de las funciones GABAérgicas en este modelo de Parkinson (Pedneault y Soghomonian, 1994; Soghomonian y col., 1994).

Por otro lado, lesiones como la hipoxia y la isquemia también generan un aumento en la señal para esta enzima, probablemente como una compensación a la pérdida de neuronas GABAérgicas (Najlerahim y col., 1991; Romijn y col., 1993; Saji y col., 1994). En varios modelos de epilepsia experimental también se ha encontrado modificación a nivel del sistema GABAérgico y específicamente de la GAD, como en el caso de las crisis inducidas por la aplicación de pilocarpina o hidrazona, en el modelo del kindling y de la epilepsia del lóbulo temporal (Feldblum y col., 1990; Massieu y col., 1994; Obenaus y col., 1993; Sonnenberg y col., 1991). En particular, en los trabajos de Feldblum en los que se lesiona unilateralmente el hipocampo con ac. kaínico se muestra un aumento duradero en los niveles de mRNA para la GAD en varias estructuras bilaterales así como en las neuronas del hilus del giro dentado ipsilateral. Esta respuesta podría ser un índice de la plasticidad de las neuronas GABAérgicas, como un mecanismo compensatorio general en respuesta a la hiperexcitación después de esta lesión (Feldblum y col., 1990).

Se ha reportado la influencia de los esteroides en la susceptibilidad a la actividad epileptiforme. Al respecto el trabajo de Weiland (Weiland, 1992), demuestra que en ratas tratadas con estradiol, los niveles de mRNA-GAD aumentan en las neuronas GABAérgicas asociadas con la capa piramidal de CA1 y que el tratamiento de estradiol con progesterona revierte este aumento e induce una pequeña disminución en el hilus del giro dentado; por lo que se sugiere que estos esteroides pudieran alterar la actividad epileptiforme, al aumentar o disminuir la actividad de las neuronas GABAérgicas en el hipocampo. Al respecto, se ha demostrado que los metabolitos reducidos de la

progesterona y deoxicorticosterona y sus análogos sintéticos se unen a sitios específicos dentro del canal hidrofóbico del complejo-receptor GABA<sub>A</sub> actuando como efectores alostéricos positivos y estimulando la conductancia al Cl<sup>-</sup>. Asimismo, los metabolitos esteroideos pregnenolona-sulfato y dehidroepiandrosterona-sulfato han sido identificados como efectores alostéricos negativos del GABA; por lo que estos esteroides pudieran estimular el desarrollo de una clase nueva de drogas ansiolíticas, sedativo-hipnóticas, anticonvulsivantes, anestésicas y relajantes musculares que pudieran estar libres de muchos de los efectos colaterales asociados con las benzodiazepinas y barbitúricos (Deutsch y col., 1992).

Estudios recientes han demostrado la presencia de las dos formas de la GAD en las células β-pancreáticas, aunque con un mayor contenido de mRNA para la GAD<sub>67</sub>, y se considera que ambas formas son autoantígenos en los modelos de roedores relacionados con la diabetes mellitus dependiente de insulina (Faulkner-Jones y col., 1993); la GAD<sub>65</sub> se encuentra en tres formas en las células β del páncreas: soluble hidrofílica, soluble hidrofóbica e hidrofóbica unida a membranas (Nathan y col., 1994); esta unión tanto a membranas de microvesículas en las células β del páncreas o a las vesículas sinápticas de las neuronas GABAérgicas, requiere los residuos de aminoácido 24-31 para permitir esta unión (Shi y col., 1994).

### 3.2 RECEPTORES

El efecto electrofisiológico del GABA esta dado por su acoplamiento a los receptores de membrana, los cuales se dividen en dos tipos, GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> (Bormann, 1988).

#### 3.2.1. GABA<sub>A</sub>

El receptor GABA<sub>A</sub> es una proteína hetero-oligomérica acoplada a un canal de cloro y presenta varios sitios de modulación. Al activarse produce una hiperpolarización que inhibe la excitabilidad neuronal, es decir, induce un potencial postsináptico inhibitorio rápido (IPSP). Este receptor es sensible al

GABA y análogos estructurales como el muscimol, la isoguvacina y el 4,5,6,7-tetrahidroisoxazol-piridinol (THIP) (Ticku, 1991). Su efecto se ve bloqueado por antagonistas de este receptor como la bicuculina y la picrotoxina, que reducen la corriente de cloro generada por la activación del receptor; esta corriente se ve aumentada por compuestos que modulan al receptor, como las benzodiazepinas, los barbitúricos y los neuroesteroides (Olsen, 1981; 1987; Olsen y Venter, 1986). El neuroesteroide 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -dihidroprogesterona se une al sitio del canal a cloro y actúa como un modulador endógeno (Puia y col., 1990).

#### A) ESTRUCTURA Y REGULACION

El receptor GABA<sub>A</sub> fué purificado por cromatografía de afinidad utilizando la benzodiazepina 1012-S como el ligando inmovilizado (Taguchi y Kuriyama, 1984). La proteína purificada del cerebro de rata tiene un peso molecular de aproximadamente 300 000 D. y consiste de una combinación de 4 o 5 subunidades. Se ha reportado hasta el momento la presencia de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\rho$ . La combinación de estas subunidades resulta en la gran heterogeneidad del complejo-receptor GABA<sub>A</sub>. La secuencia de estas subunidades presenta una homología del 20-30% (Pritchett y col., 1989; Schofield y col., 1987; Shivers y col., 1989).

**TABLA 6. LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>**

$\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6

$\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ '4

$\gamma$ 1,  $\gamma$ 2S,  $\gamma$ 2L,  $\gamma$ 3

$\delta$

$\rho$ 1,  $\rho$ 2

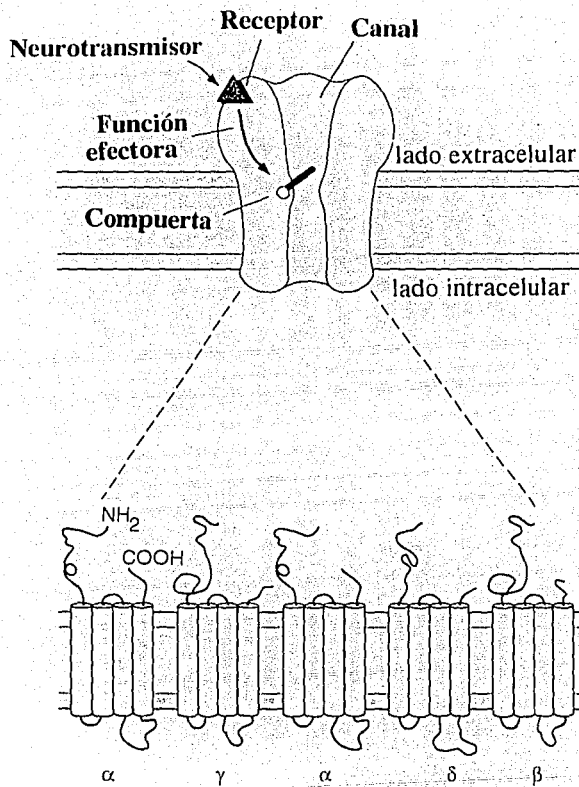
$\beta$ 4,  $\beta$ '4,  $\gamma$ 2S,  $\gamma$ 2L. Se obtienen por corrimiento del marco de lectura (splicing alternativo). Tabla tomada del Kuriyama, K. y col., 1993.

Cada subunidad presenta 4 regiones de hidrofobicidad, esto es 4 dominios

transmembranales, de estos el II es importante en la formación del canal iónico. En el anillo intracelular entre los dominios III-IV se presentan los sitios de fosforilación para la proteína cinasa dependiente de cAMP o de la proteína cinasa C; se considera que la fosforilación del receptor GABA<sub>A</sub> modula la función y expresión de éste (Heuschneider y Schwartz, 1989; Kirkness y Turner, 1988). Estudios in vitro, muestran que el pH extracelular puede modular la actividad de los receptores en las células granulares del cerebelo (Robello y col., 1994). Por otro lado, la sensibilidad a las benzodiazepinas es conferida por la presencia de la subunidad  $\gamma 2$  (Pritchett y col., 1989); la subunidad  $\alpha$  también es importante para el sitio de unión a las benzodiazepinas y afecta las propiedades del sitio de unión al GABA (Sigel y col., 1992). La estructura de la subunidad  $\beta$  afecta las propiedades del canal y la eficacia a las benzodiazepinas (Sigel y col., 1990; Verdoorn y col., 1990). Finalmente, la subunidad  $\rho$  se ha encontrado solo en retina.

## B) DISTRIBUCION

Trabajos de inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales dirigidos a las subunidades del receptor, así como estudios de hibridación in situ que permiten evaluar la expresión del mRNA para las diferentes subunidades, han revelado una amplia y diferente distribución de éstas a nivel del SNC (Araki y col., 1992; Araki y Tohyama, 1992; Ewert y col., 1992; Laurie y col., 1992; Tyndale y col., 1994; Wisden y col., 1992). Esto sugiere que posiblemente exista una gran variedad de subtipos del receptor con diferente composición y propiedades farmacológicas, localizados en regiones del SNC que se requieran o necesiten. Diversos estudios también han revelado una regulación en la expresión del receptor durante el desarrollo que se puede correlacionar en algunos casos al establecimiento in vivo de las conexiones neuronales y con efectos tróficos del GABA (Rothe y col., 1988; Thompson y Stephenson, 1994).



**FIGURA 5.** Modelo del complejo-receptor GABA<sub>A</sub>. El receptor está acoplado a un canal a Cl<sup>-</sup> compuesto de 5 subunidades, que incluye los polipéptidos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\rho$ . La composición estequiométrica exacta de las subunidades se desconoce hasta el momento. Cada subunidad presenta 4 dominios transmembranales, uno o más de los cuales contribuye a la pared del canal iónico. Tomado de Kandel, E. R. y col., 1991.

### C) RELACION DEL RECEPTOR CON DIFERENTES AFECCIONES

Diversos trabajos han revelado que lesiones isquémicas disminuyen la función y densidad de los receptores GABAA y que otra porción de éstos se mantiene de reserva, posiblemente para aumentar la neurotransmisión inhibitoria pérdida y proteger selectivamente regiones vulnerables contra la muerte celular mediada por sobreexcitación (Johansen y col., 1991; Mileson y col., 1992). Asimismo, se ha encontrado en diferentes modelos de epilepsia experimental, como el kindling, un aumento de la unión del GABA y benzodiazepinas al receptor, así como de la expresión de algunas subunidades en el giro dentado del hipocampo (Clark y col., 1994; Olsen y col., 1990; Shin y col., 1985). Por otro lado, se ha observado que la exposición crónica de GABA en neuronas corticales en cultivo, disminuye la expresión del mRNA, así como de la proteína de algunas subunidades; se presenta una "down regulation" del complejo-receptor GABAA, la cual puede estar relacionada con una disminución en el número de los sitios de unión al GABA en las neuronas corticales (Mhatre y Ticku, 1994). Asimismo, se ha observado que en el síndrome de abstinencia al etanol se presenta un aumento en la sensibilidad del receptor a los antagonistas; se ve aumentada la expresión de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 6$  (Keir y Morrow, 1994; Mhatre y Ticku, 1992).

#### 3.2.2. GABA B

El receptor GABAB es una proteína de aproximadamente 80 Kd. que esta acoplada a canales iónicos de calcio o potasio por la vía de proteínas que unen GTP, como  $G_i$  o  $G_o$ . Se ha observado que la activación del receptor inhibe a la adenilato ciclasa vía proteínas G, pero también inhibe la formación de fosfatos de inositol, por lo que se ha sugerido que este receptor esta negativamente acoplado al recambio de fosfatos de inositol (Crawford y Young, 1988; Godfrey y col., 1988). No esta claro si el mismo receptor inhibe ambos sistemas o si existen diferentes tipos de este receptor (subclases) que sean responsables de la inhibición de estos sistemas de transducción de señales. El efecto de la activación de este receptor es

la inhibición de canales de calcio dependientes de voltaje y un aumento en la conductancia al potasio, lo cual resulta en la generación de IPSPs lentos; este efecto inhibe la liberación de neurotransmisores (Holz y col., 1986). Los aspectos farmacológicos muestran que el receptor es sensible a GABA, baclofen y al ac. 3-aminopropilfosfonoso (APPA) tanto a nivel del SNC como el periférico (Ong y col., 1990). Antagonistas selectivos de este receptor son el flaclofen, el 2-hidroxi saclofen, y el CGP35348 (Olpe y col., 1990).

Se han producido anticuerpos monoclonales contra el receptor GABAB (Nakayasu y col., 1992). Los receptores se han localizado a nivel presináptico y postsináptico, tanto a nivel del SNC como periférico (Alford y Grillner, 1991; Nisenbaum y col., 1992). Al respecto se ha reportado que la inhibición sináptica causada por este receptor en la médula espinal, reduce la duración del potencial de acción presináptico, reduciendo la liberación de neurotransmisores (Alford y Grillner, 1991). Asimismo, se ha observado una modulación presináptica del receptor sobre la excitación glutamatergica y la inhibición GABAérgica en las neuronas neocorticales (Nisenbaum y col., 1992).

Por otro lado, la activación del receptor GABAB por baclofen in vitro, induce potenciación de largo plazo (LTP) y actividad epileptiforme por un efecto inhibitorio sobre las interneuronas GABAérgicas que inhiben la capa de células granulares del giro dentado del hipocampo (Burgard y Sarvey, 1991). Estudios recientes han demostrado en un modelo computacional que una disminución crítica en la conductancia del receptor GABAA, así como un aumento en la corriente generada por el receptor GABAB en las células tálamo-corticales, puede transformar ritmos normales de 9-11 Hz en oscilaciones lentas de 3 HZ que se presentan en los modelos de animales epilépticos que presentan ausencias. En base a esto los autores sugieren que la aplicación de antagonistas al receptor GABAB pudieran ser utilizados para transformar las descargas patológicas del petit mal en ritmos con rangos de frecuencia normal (Wallenstein, 1994).



### 3.3. GABA Y EPILEPSIA

En varios modelos de epilepsia experimental, existe evidencia de alteraciones en la transmisión mediada por el GABA. Entre los parámetros neuroquímicos asociados a la epilepsia, se encuentra una disminución en la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (enzima de síntesis del GABA, GAD), como en el caso del modelo de epilepsia focal SAC (Síndrome de Abstinencia al GABA) y el de la cepa mutante de ratón C57BL/10Bg con crisis tipo ausencia (Arias y col., 1992; Brailowsky y col., 1990b; Ortiz y col., 1990). Asimismo, se presenta una reducida sensibilidad al GABA en ratones de la cepa DBA2 J que son susceptibles a las crisis audiogénicas, así como una disminución de los niveles de GABA en el líquido cefaloraquídeo en niños con espasmos (Ito, 1994).

Sin embargo, existe evidencia que demuestra resultados contradictorios como en el caso de los pollos y el gerbil con susceptibilidad a las crisis, donde se ha encontrado un aumento en la concentración de GABA y en las neuronas que expresan a la GAD, lo que pudiera considerarse como un proceso adaptativo a las crisis espontáneas o al déficit en los mecanismos post-sinápticos (Faingold, 1988; Johnson y Tuckek, 1987; Peterson y col., 1985). Aunque en algunos modelos como el de la cepa de ratas genéticamente propensas a la epilepsia (GEPR), el aumento en las neuronas que expresan la GAD no parece estar relacionado con la crisis y se sugiere una posible reducción en la eficacia de los receptores GABAérgicos (Faingold, 1988; Gould y col., 1991) o una anomalía en el circuito neuronal, como en el caso de neuronas GABAérgicas que inhiban a otras neuronas GABAérgicas y el efecto neto sea la desinhibición (Roberts y col., 1985a; Roberts y col., 1985b).

Por otro lado, se han observado alteraciones genéticas que se presentan durante las crisis, como en el trabajo de Obenaus y col. (Obenaus y col., 1993) donde se encontró en el modelo de crisis inducido por pilocarpina, una pérdida de mRNA de la GAD en el giro dentado de la rata. En el modelo de epilepsia del lóbulo temporal de la cepa de ratón E1, se ha mostrado evidencia de una alteración genética en la captura de GABA (Janjua y col., 1991). Trabajos recientes muestran alteraciones en la expresión genética del receptor GABA<sub>A</sub> en algunos

modelos de epilepsia; al respecto Friedman, L. K. y col. (Friedman y col., 1994), encuentran disminuida la expresión del mRNA de la subunidad  $\alpha 1$  del receptor, de una manera específico-celular en el hipocampo de ratas adultas con status epilepticus inducido con kainato. Además, existe evidencia que muestra que los receptores GABA<sub>A</sub> que contienen a la subunidad  $\alpha 1$  constituyen el 50% de los receptores al nacimiento y el porcentaje aumenta a 95% en el estado adulto, lo que sugiere que los receptores difieren en los infantes y adultos. Estos hallazgos son de suma importancia para el entendimiento y tratamiento de estados patofisiológicos (Brooks-Kayal y Pritchett, 1993).

Existe evidencia de que algunas estructuras son sumamente susceptibles a las crisis y que guardan cierta relación con el metabolismo del GABA; al respecto, Kolasa y col. (Kolasa y col., 1992) han demostrado que lesiones electrofíticas bilaterales en el núcleo rojo de la rata generan un aumento en la susceptibilidad a las crisis convulsivas inducidas por pilocarpina, ácido kaínico, isoniazida, pentilentetrazol, bicuculina y el electroshock, relacionada con una disminución en la concentración de GABA en la sustancia nigra, ya que esta estructura recibe aferencias del núcleo rojo; por lo que se propone que el núcleo rojo participa en la generalización y aceleración de las crisis a través del sistema GABAérgico. De igual manera, se ha reportado que la transmisión GABAérgica en el núcleo medial intralaminar del tálamo controla el umbral de las crisis convulsivas al regular la excitabilidad de otras estructuras (Miller y Ferrendelli, 1990). Se ha reportado que las sinapsis GABAérgicas localizadas en el núcleo talámico posterior podrían ser parte de un circuito que propague las crisis o las controle y que incluye a otras estructuras como el estriado, la sustancia nigra y el colículo superior (Garant y col., 1993). Gale y col. (Gale, 1992) por su parte, han demostrado que la aplicación de cantidades sumamente pequeñas de antagonistas GABAérgicos en la corteza piriforme, inducen convulsiones y que las conexiones bilaterales del telencéfalo caudal son esenciales para estas crisis. Gale (Gale y col., 1992), sugiere que el papel anticonvulsivo del GABA debe tomarse bajo cierta consideración, ya que existen pocas regiones específicas en el cerebro en las cuales el GABA tiene este efecto y solo el aumento del GABA

asociado con las terminales nerviosas y no el relacionado con aspectos metabólicos, parece tener importancia en el fenómeno epiléptico.

Por otro lado, la mayoría de los compuestos antiepilépticos disponibles se dirigen directamente a los componentes de los receptores a glutamato y GABA (Dichter, 1994); tal es el caso de los agonistas al receptor GABAA; como la administración de progabida que acorta la duración de las post-descargas y atenúa la severidad de la respuesta convulsiva en el kindling producido en la corteza, la amígdala y el hipocampo (Sato y col., 1990). Estos agonistas tienen efectos anticonvulsionantes sobre el inicio y las crisis límbicas secundariamente generalizadas (Morimoto y col., 1993). Asimismo, compuestos moduladores del receptor GABAA, como las benzodiazepinas y los barbitúricos, que facilitan la eficacia de la neurotransmisión GABAérgica, y los inhibidores de la captura de alta afinidad del GABA que facilitan la acción del GABA sobre su receptor (Olsen y Venter, 1986) se consideran potentes anticonvulsivantes. Los inhibidores de la captura que actúan sobre el sistema de transporte presente en las células astrogliales son más efectivos que los que actúan en las células neuronales (Schousboe y col., 1992).

De igual manera, cuando se administra vigabatrina (un inhibidor de la enzima que degrada el GABA, la GABA-transaminasa), se produce un aumento en la concentración de GABA en el cerebro de 2-3 veces con respecto a los controles, que es capaz de ejercer un efecto anticonvulsivo (Liu y col., 1992); se le ha utilizado como un antiepiléptico en el tratamiento de las crisis parciales y tónico-clónicas secundariamente generalizadas (Mattson y col., 1994). En base a estos y otros estudios realizados, que muestran que los agentes GABAérgicos protegen contra la actividad neuronal excesiva en general y los episodios de crisis en particular, se ha llegado a la hipótesis de que las deficiencias en la transmisión GABAérgica son un factor etiológicamente importante para la epilepsia.

#### **4. EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA AL GABA (SAG)**

Los estudios iniciales sobre este síndrome se llevaron a cabo en los *Papio papio* fotosensibles, originarios del Senegal, descritos primeramente por

Killam y Naquet en 1967 (Killam y col., 1967); estos animales son muy útiles para el análisis de los mecanismos patofisiológicos involucrados en la epilepsia generalizada de origen cortical y para la evaluación preclínica de fármacos potencialmente anticonvulsivantes. En este modelo de epilepsia generalizada en primates, los animales responden a la estimulación con flashes intermitentes de una frecuencia de 25 Hz. lo que induce actividad paroxística que muestra su máxima expresión en las regiones fronto-rolándicas de ambos hemisferios cerebrales y que precede generalmente a la conducta (Silva-Comte y col., 1982). Se pueden observar desde mioclonias de los párpados hasta crisis tónico-clónicas de tipo gran mal. Los generadores neuronales de estas descargas se han localizado en la corteza motora. Los estudios farmacológicos en estos animales han demostrado que la administración de agentes GABAérgicos tienen un efecto anticonvulsivante y los agentes que afectan esta transmisión facilitan la fotosensibilidad (Horton y Meldrum, 1973; Meldrum y Champman, 1986).

En experimentos realizados por Brailowsky y col. (Brailowsky y col., 1989) en los que se elevó la concentración de GABA extracelular por medio de instilaciones focales de GABA en diferentes regiones corticales del cerebro del mono, en animales fotosensibles y no fotosensibles, el aumento del GABA tuvo efecto de bloqueo completo del síndrome pero solo cuando la infusión se realizó en la corteza motora (área 4) y occipital (visual); indicando que la corteza visual tiene un papel permisivo y la corteza motora un papel ejecutivo en la expresión del síndrome fotosensible. En estos animales después de algunas horas de la suspensión del tratamiento con el GABA, se presentaron focos de actividad paroxística caracterizada por la presencia de poliespigas y actividades en forma de espiga-onda que se correlacionaban con la aparición de mioclonias de las porciones distales del miembro inferior. La duración de estos focos fue de 3 a 5 días, al término del cual coexistían con el síndrome fotosensible (epilepsia generalizada con la epilepsia parcial). A este modelo de actividad epiléptica focal se le ha denominado "Síndrome de Abstinencia al GABA" (SAG) ya que los animales presentaron signos electroclínicos de epilepsia como consecuencia de la suspensión del tratamiento con el GABA.

#### 4.1 EL SAG EN LA RATA

En los experimentos realizados en ratas con kindling de amígdala (un modelo de epilepsia focal crónica), que presentaron crisis generalizadas con pérdida del equilibrio, la infusión de GABA disminuyó las crisis, pero una vez suspendida ésta (7 días), se presentó un fenómeno epileptogénico en el área infundida; este SAG se presentó en ambas cortezas somatomotoras, ya que la infusión del GABA fué bilateral (Fukuda y col., 1987).

El SAG se confirmó en ratas no epilépticas con infusiones unilaterales de GABA a nivel de la corteza y del sistema límbico; sin embargo, las estructuras corticales respondieron más tempranamente que las del sistema límbico, excepto el hipocampo que presentó latencias cortas; la duración del SAG a nivel de hipocampo y de la amígdala fué muy corto (no más de 12 horas). De estos experimentos se concluyó que la susceptibilidad a la epileptogénesis varía de acuerdo al estímulo desencadenante ya que la susceptibilidad en el sistema límbico es menor para la expresión del SAG (Le Gal La Salle y col., 1988), al menos cuando las infusiones del aminoácido son de más de 24 horas.

#### 4.2 INDUCCION DEL SAG

Los estudios que relacionan el tiempo de infusión del GABA (100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hr}$ ) con la inducción del SAG (latencia y duración del fenómeno paroxístico), muestran una relación inversa entre el tiempo de infusión, la latencia y duración del SAG: a tiempos de infusión más cortos corresponde un SAG de latencia y duración largas (Brailowsky y col., 1988). Estudios recientes han demostrado que cambios en la velocidad de flujo de la instilación del GABA de 1  $\mu\text{l}/\text{hora}$  a 3  $\mu\text{l}/\text{hora}$ , pueden inducir la aparición de un SAG con sólo 30 minutos de infusión. Este SAG de inducción rápida puede presentarse a las concentraciones del GABA infundido de: 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y hasta 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (comunicación personal, Brailowsky, S.).

### 4.3 PATRONES EEG DEL SAC

La morfología EEG del SAC se caracteriza por la presencia de 3 patrones: a) Patrón I, constituido por espigas de alta amplitud, monofásicas, seguidas por una deflexión pequeña y negativa (actividad espiga-onda única) de 200 a 700  $\mu\text{V}$  de amplitud y a una frecuencia de 0.5 a 3 Hz. En la mayoría de los casos se presenta unilateralmente, marca el inicio del SAC y se puede propagar a la corteza contralateral homóloga; b) patrón II, menos frecuente que el patrón I (61.5% de todos los casos estudiados) y generalmente con una duración corta. Esta constituido por elementos en forma de espiga-onda seguido de poliespigas de alta frecuencia (8-10 Hz); la actividad paroxística es frecuentemente bilateral con un predominio del sitio infundido; este patrón predomina durante las primeras 3 a 4 horas del inicio del SAC. En las fases iniciales del SAC, estos dos patrones se pueden acompañar de mioclonías contralaterales y, c) el patrón III, observado en el 51.3% de los casos, esta formado por espigas que se propagan a las áreas homólogas del hemisferio opuesto en forma de crisis de varios segundos de duración, acompañadas de inmovilidad del animal y en ocasiones de las llamadas "sacudidas de perro mojado". Estas crisis se mezclan con el patrón I y se observan en las primeras 2 a 3 horas después del inicio del SAC. En todos los casos, el final del SAC se anuncia como la desaparición de la actividad paroxística durante la vigilia y el sueño de movimientos oculares rápidos, y su reaparición durante el sueño de ondas lentas, tanto para los SAC cortos como largos (Brailowsky y col., 1990a).

La fenomenología del SAC puede dividirse en tres fases principales: 1. La iniciación, que es la aparición abrupta de descargas epilépticas rítmicas localizadas en el sitio de infusión y con una duración de segundos a minutos después de la suspensión del GABA; 2. la propagación, que es el inicio de la complicación de los patrones EEG que muestran actividad en forma de poliespigas y crisis que puede tener una expresión bilateral pero que predomina en el sitio de infusión, en esta fase se presentan las manifestaciones clínicas y no excede de 4 horas después del inicio y, 3. la fase de recuperación, que se caracteriza por la desaparición de las poliespigas y las crisis así como de los síntomas clínicos. La

actividad paroxística esta restringida al sitio de infusión con una disminución de la amplitud y la frecuencia. Esta fase presenta una duración de 24 horas a 7-10 días.

Las fases de iniciación y propagación pudieran ser considerados como la liberación de la inhibición tónica producida por la suspensión de grandes cantidades de GABA. Esta liberación pudiera permitir todas las manifestaciones electroclínicas del fenómeno paroxístico. La fase de recuperación del SAG y su extinción parecen estar relacionadas con la actividad GABAérgica, ya que la administración sistémica de inhibidores de la síntesis del GABA (alilglicina) es capaz de reactivar el SAG (Brailowsky y col., 1990a).

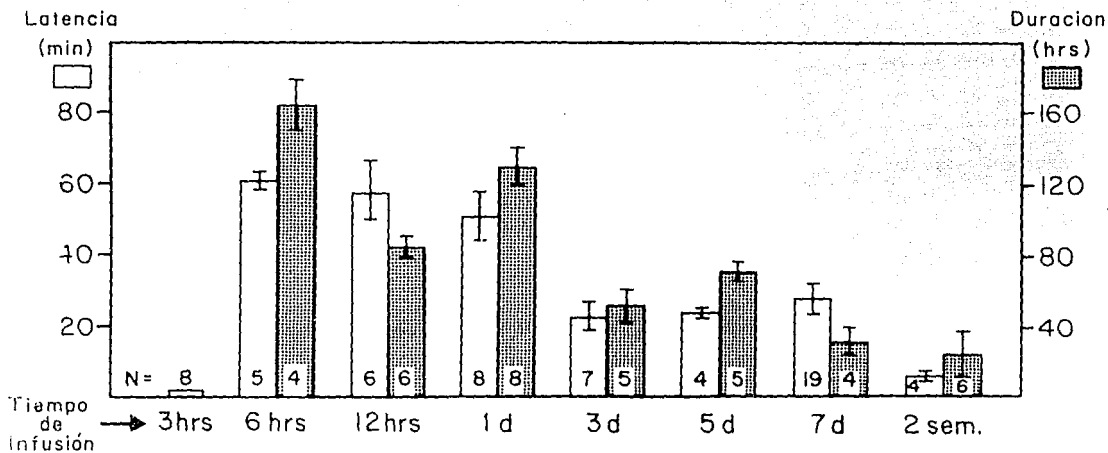
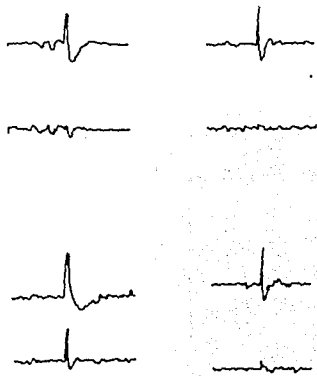


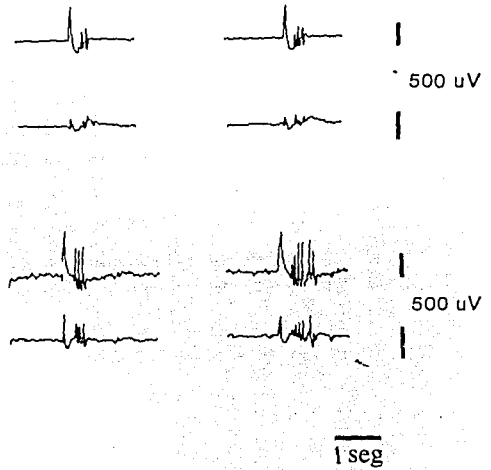
FIGURA 6. Relación entre tiempo de infusión intracortical del GABA (indicado en las absisas, en horas, días o semanas) y la latencia (eje de la izquierda, indicada en minutos) y la duración (eje de la derecha, indicada en horas) del fenómeno epiléptico. Cada barra indica la media  $\pm$  error estándar y el número de animales (N). Tomado de Brailowsky, S. 1991.



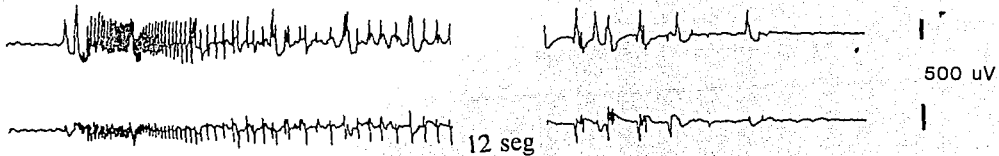
### PATRON I



### PATRON II



### PATRON III



**FIGURA 7.** Patrones electroencefalográficos (EEG) del Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG) en la rata. Los registros se obtuvieron de la región entre la cánula de infusión y el tornillo epidural localizado 3-4 mm anterior a Bregma. Trazo superior: corteza frontal izquierda. Trazo inferior: corteza frontal derecha. El GABA fué aplicado del lado izquierdo y la solución salina del lado derecho. El registro EEG inferior fué acortado 12 segundos. Tomado de Brailowsky, S. y col., 1990a.

#### 4.4 CAMBIOS QUE SE PRESENTAN DURANTE EL SAG

##### CAMBIOS HISTOLOGICOS:

Los cambios histológicos asociados al SAG se caracterizan por gliosis reactiva (inmunohistoquímica con el anticuerpo de la proteína ácida fibrilar glial GFAP) a nivel del sitio de infusión y en aquellas estructuras que reciben proyecciones de la zona cortical infundida (núcleos tálamicos del grupo ventromedial y reticular), estas últimas sólo en casos de actividad paroxística duradera. Se presenta además pérdida de tejido a nivel de las áreas en las que se implantó las cánulas-electrodo de infusión. Hasta la fecha no se ha encontrado una correlación entre el tamaño de la lesión y la latencia o duración del SAG; asimismo se ha observado clínicamente que no todas las lesiones cerebrales pueden inducir un fenómeno epiléptico. En estudios posteriores, se vió que la infusión de taurina o glicina producía los mismos efectos histológicos a nivel del sitio de infusión; sin embargo, no se presentaron síntomas de abstinencia. En la zona talámica de proyección de la corteza motora, los cambios glióticos probablemente se deban a la liberación de aminoácidos excitadores a partir de las terminales córtico-tálamicas que son de tipo glutamatérgico (datos no publicados, Braiowsky, S.). Al respecto existe evidencia en otros modelos de epilepsia focal de origen cortical, en los que se ha observado lesiones a nivel talámico y la protección que presentan los antagonistas al receptor del glutamato tipo NMDA (Clifford y col., 1989; Collins y Olney, 1982).

##### CAMBIOS METABOLICOS:

En el modelo del SAG con infusiones crónicas de GABA (5 días), se han observado cambios metabólicos a través de mediciones de la utilización de la glucosa a nivel cerebral. Esta técnica que utiliza la 2-desoxiglucosa (2-DG) radioactiva nos permite observar la acumulación en el sitio de su utilización mediante autoradiografía; en estos experimentos se presenta un aumento de 2 a 3 veces en una área de 1-1.5 mm de diámetro que abarca todas las capas corticales

en el sitio de infusión del GABA. También se observa un aumento de 3 a 5 veces en algunos núcleos talámicos ipsilaterales de proyección de la zona cortical infundida (núcleos posterior oralis, ventro-postero-lateral, central-lateral, ventro-lateral y reticular). Los cambios observados a nivel talámico son secundarios a la actividad epileptogénica cortical (Menini y col., 1991).

#### CAMBIOS MICROFISIOLÓGICOS:

Trabajos electrofisiológicos han demostrado que en el SAG in vitro (a partir de rebanadas de la corteza cerebral obtenidas de ratas con SAG) se presentan 3 tipos de células: 1) Las células IB (intrinsic bursting) con capacidades intrínsecas de generar deflexiones despolarizantes paroxísticas (PDS) cuando se estimulan sinápticamente y trenes de potenciales de acción de alta frecuencia provocados por la inyección intracelular de corriente; estas células presentan una mayor tolerancia a los efectos hiperpolarizantes de la isoguvacina (agonista específico al receptor GABAA) al aplicarse al baño en el que se mantienen las rebanadas; 2) las células SB (synaptic bursting) con capacidad de generar PDSs y trenes de potenciales de acción sólo cuando se estimulan sinápticamente y, 3) las células NB (not bursting) que no presentan actividad paroxística bajo ninguna de estas dos estimulaciones (Silva-Barrat y col., 1989; Silva-Barrat y col., 1992).

Las propiedades del primer tipo de células se han correlacionado con una disminución en la sensibilidad celular al GABA y al agonista al receptor GABAA (isoguvacina), causados por una exposición prolongada al GABA. Otra posibilidad según los autores es que la desensibilización de los receptores se deba a una disminución en el número o en su afinidad por el GABA, o por un aumento en los mecanismos de recaptura; no se descarta la posibilidad de que el calcio pueda afectar de forma directa al receptor o a través del estado de fosforilación del propio receptor GABAA (Silva-Barrat y col., 1989; Silva-Barrat y col., 1992). Sin embargo, trabajos recientes de este grupo (Silva-Barrat y Champagnat, 1995), en rebanadas de corteza, han demostrado que las ráfagas que se presentan durante el SAG son generalmente potenciales de meseta dependientes de  $Ca^{2+}$  que son finalizados por una corriente de  $K^{+}$  altamente

sensible al tetraetilamonio (TEA). Los autores proponen que la conductancia de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  ( $g_{K(Ca)}$ ) participa en la forma de las ráfagas dependientes de  $Ca^{2+}$  durante el SAG.

#### CAMBIOS NEUROQUIMICOS:

Experimentos en los que se midieron los niveles totales de GABA y la actividad de la enzima responsable de la síntesis del GABA, la glutamato descarboxilasa (GAD) revelan que los niveles de GABA aumentan de 3-6 veces después de la infusión del GABA y antes de la presencia de las descargas del fenómeno epiléptico. Durante las descargas epilépticas, los niveles del GABA regresan gradualmente a los valores normales. Con respecto a la actividad de la GAD, disminuye 28%, 37% y 48% con períodos de infusión de 2, 6 y 24 horas, respectivamente. Esta disminución se observó en la corteza infundida y no en la contralateral o en el tejido de ratas controles (con infusiones de solución salina al 0.9%); la actividad de la GAD permanece disminuida durante el fenómeno epiléptico y regresa a niveles del control después de la recuperación del SAG. La actividad de la GAD es similar en presencia o ausencia del cofactor fosfato de piridoxal (PLP). Los autores sugieren que la disminución en la actividad de la GAD observada después de la infusión del GABA en la corteza motora, se debe a una disminución en la velocidad de síntesis de la enzima y que la concentración de GABA intracelular pudiera ser un factor de regulación de la síntesis de la misma in vivo (Rimvall y Martin, 1992). Asimismo, la correlación temporal entre el regreso de los niveles de GABA a los valores normales, la persistencia de la actividad de la GAD disminuida y la presencia de las crisis EEG, sugiere que una disminución en la síntesis de GABA probablemente participe en el síndrome epiléptico (Salazar y col., 1994).

#### 4.5 FARMACOLOGIA DEL SAG

Estudios farmacológicos preliminares muestran que en sus fases iniciales, el SAG es resistente a anticonvulsivos de uso clínico como: la fenitoina, los barbitúricos, la etosuccimida, el valproato, la carbamazepina y el diazepam; esta

última benzodiazepina y el pentobarbital a dosis anestésicas, no han afectado la frecuencia de descarga del foco epiléptico. En el segundo día del SAG existen efectos anticonvulsivos con la administración de antagonistas al receptor NMDA (ketamina, APH y MK-801) o benzodiazepinas como el clonazepam. El anticonvulsivo de síntesis nacional HEPP (hidroxi-etil-propionamida) (Tapia y col., 1979) disminuye transitoriamente la frecuencia de descarga del foco epiléptico sólo en la primera hora después de la presencia del SAG; la reinfusión local del GABA inhibe el síndrome epiléptico. Otro aminoácido, la taurina no presenta efectos anticonvulsivos en el SAG (Brailowsky y col., 1990b).

En otros trabajos en los que se ha administrado en ratas con SAG el antagonista no competitivo al receptor NMDA, fenciclidina, y el antagonista al calcio flunarizina, antes de la suspensión de la infusión del GABA, se encontró que sólo la fenciclidina previene el desarrollo del SAG. En ratas en las que se administraron los fármacos después de la suspensión del GABA, no se encontró efecto anticonvulsivo (Silva-Barrat y col., 1992). Los trabajos *in vitro*, muestran que la aplicación de antagonistas al receptor NMDA (2-APV) en el baño donde se mantienen las rebanadas de corteza de cerebro obtenidas de ratas que presentan SAG, reducen la amplitud y duración de las PDSs en las células y que los antagonistas orgánicos e inorgánicos de calcio suprimen la actividad paroxística en las neuronas IB. El quelante de calcio EGTA incrementa la amplitud y duración de las PDSs y favorece la presencia de potenciales de acción adicionales en los dos tipos de células SB e IB. Los autores concluyen que las corrientes de calcio dependientes de voltaje son las responsables de generar la actividad paroxística en las neuronas piramidales IB pero no de la epileptogénesis. Los canales catiónicos asociados al receptor NMDA participan en la epileptogénesis y parcialmente en la inducción de las PDSs observadas durante el SAG; existen sin embargo, varios factores en la génesis del fenómeno que explicaría la refractoriedad del SAG a la administración de los bloqueadores de calcio, antagonistas al receptor NMDA o a los agonistas al receptor GABA<sub>A</sub> (Silva-Barrat y col., 1992). También se ha observado que el TEA, un bloqueador de la  $g_{k(ca)}$  y otras corrientes de  $K^+$ , aumenta dramáticamente la duración de las PDSs hasta en

un 158% en las células IB y SB, considerando la importancia que representan estas corrientes durante el SAC.

Las propiedades de este modelo nuevo de epilepsia focal (SAC), se asemejan a varios cuadros de epilepsia parcial: un cuadro de status epiléptico focal; un síndrome de epilepsia parcial continua caracterizado por descargas focales asociadas a mioclonus y a descargas epileptiformes lateralizadas periódicas; un cuadro de epilepsia focal intratable y un síndrome de abstinencia o carencia.

## **5. PROTO-ONCOGENES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Los proto-oncogenes se consideran la contraparte celular de los genes transformados virales que requieren de su activación para iniciar su potencial oncogénico. En el cerebro los proto-oncogenes pudieran representar los elementos genéticos que median cambios de corto a largo término en la función neuronal; tal es el caso de alteraciones en los programas durante el desarrollo, la formación o diferenciación de los fenotipos neuronales y en la formación de patrones, así como alteraciones en la actividad celular de la neurona madura (Hanley, 1988). Fisiológicamente, estas moléculas participan en los procesos de transducción de señales; estas cascadas de información se consideran como vías bioquímicas multicomponentes que están acopladas a su ambiente extracelular por un sistema efector. Los productos de los proto-oncogenes (proteínas) forman parte de estas cascadas ya sea como primeros mensajeros (c-sis, int-2), receptores, (c-erb-B, c-ros, c-kit), proteínas G (c-H-ras, c-K-ras), cinasas (c-raf, c-mos) y proteínas nucleares (c-fos, c-jun, c-myc). Estas últimas proteínas juegan un papel importante en la transducción de señales, acoplando el estímulo extracelular con eventos transcripcionales (Morgan, 1991). Hasta la fecha se ha reportado que estas proteínas nucleares se unen a una secuencia del DNA específica que se requiere para la expresión y regulación del gen normal. Entre estas proteínas nucleares destacan los genes tempranos inmediatos (immediate early genes, IEGs) que constituyen el sistema homólogo de los genes celulares que coordinan la respuesta transcripcional (factores de transcripción) de la célula ante un estímulo

extracelular (Morgan, 1991). Los IEGs tienen una expresión baja en las células normales pero se pueden inducir rápidamente a nivel transcripcional en minutos ante un estímulo externo; esta inducción es transitoria e independiente de la síntesis de proteínas (Sheng y Greenberg, 1990).

**TABLA 7. GENES TEMPRANOS INMEDIATOS (IEGs)**

---

FAMILIA FOS
C-FOS
FRA-1
FRA-2
FOS-B
FAMILIA JUN
C-JUN
JUN-B
JUN-D
OTROS
ZIF/268
NUR/77
C-MYC

---

Tomada de Sheng, M y Greenberg, M. E., 1990.

### 5.1 C-FOS

Dentro de los IEGs, c-fos se induce por una gran variedad de estímulos extracelulares, como factores de crecimiento neuronal, neurotransmisores, agentes que afectan canales de calcio dependientes de voltaje (despolarización) o los acoplados a neurotransmisores (glutamato); esto puede generar en la célula: a) un aumento en el calcio intracelular que permite la formación de complejos calcio-calmodulina que a su vez activan cinasas dependientes de este complejo o, b) la estimulación de la adenilato ciclasa que aumenta los niveles de cAMP para activar cinasas dependientes de cAMP; estas dos vías permiten la fosforilación del factor de transcripción CREB (Proteína de Unión al Elemento responsivo a cAMP) que al unirse a la secuencia de DNA correspondiente permite la inducción de c-fos y otros IEGs. (Sheng y Greenberg, 1990). Los productos protéicos de c-fos y c-jun se asocian para formar un heterodímero (factor de

transcripción AP-1) que se une con alta afinidad a la secuencia de DNA denominada AP-1 o a los sitios CRE, que son secuencias importantes (sitios promotores) en la regulación de la expresión de los genes que las presentan; los productos de estos genes secundarios probablemente contribuyan a los mecanismos de adaptación o plasticidad neuronal (que puede incluir la formación del aprendizaje y memoria) generada por esta gran variedad de estímulos (Kaczmarek, 1993). Los genes con sitios AP-1 en sus promotores incluyen: la pre-proencefalina (PPE), la tirosina-hidroxilasa (TH), el neuropéptido Y (NPY), el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), la colecistoquinina (CCK), la dinorfina (DYN), la pro-proteína amiloide (APP), la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la hemo-oxigenasa, entre otros (Morgan, 1991a y b).

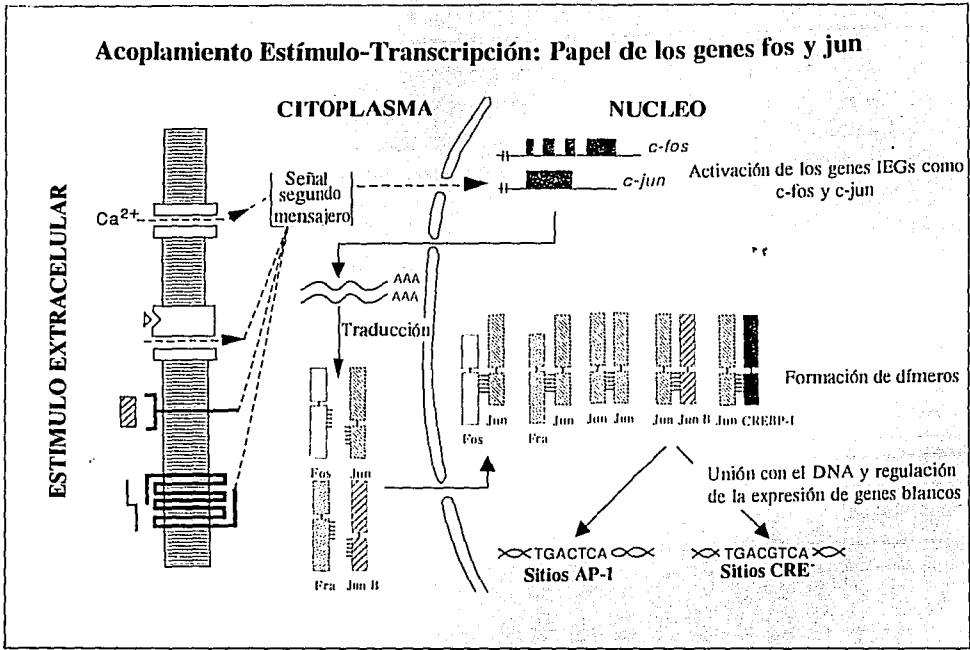
La inmunoreactividad a la proteína c-fos se ha propuesto como un marcador de la activación neuronal, además de que ofrece una resolución espacial precisa para la identificación de somas neuronales. Esta técnica también se ha utilizado para el mapeo de vías funcionales (Bullitt, 1990). En base a estos estudios y de hibridación in situ, se ha observado la inducción de c-fos ante una gran variedad de lesiones a nivel cerebral. Recientemente se ha reportado que lesiones corticales unilaterales aumentan los niveles de mRNA para varios genes inmediatos tempranos, entre ellos c-fos, en el hemisferio de la corteza lesionada; los autores sugieren que el mecanismo que genera estos cambios involucra la acción del receptor a glutamato tipo NMDA (Jacobs y col., 1994). Asimismo, lesiones corticales repetitivas generan una desensibilización en la expresión del mRNA para c-fos en la corteza dañada en la segunda y tercera lesión, pero en la cuarta lesión (24 horas después de la primera y un periodo de recuperación de 16 horas) los niveles se elevan nuevamente (Ivkovic y col., 1994).

Durante la isquemia se ha reportado un aumento de los niveles de mRNA para c-fos; esta inducción, según los autores, se debe a la despolarización post-isquémica que se presenta después de una isquemia transitoria (Ikeda y col., 1994). También se ha reportado la expresión de c-fos a nivel del hipotálamo y de tallo cerebral después de la inyección i.p. e i.v., respectivamente, de una solución



hipertónica de cloruro de sodio (Hochstenbach y col., 1993; Miyata y col., 1994). Se ha localizado inmunoreactividad a fos y jun en neuronas y astrocitos de la corteza en cerebros de personas que sufrieron la enfermedad de Alzheimer, por lo que se les ha considerado que pudieran participar en varios aspectos de esta enfermedad, ya que la proteína precursora amiloide tiene una secuencia relacionada al factor de transcripción AP-1 (Anderson y col., 1994).

Estudios recientes muestran la posible participación de c-fos en la regulación de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) específica de astrocitos, ya que se une al sitio AP-1 del segmento de DNA que codifica esta proteína y que forma parte de los sitios más críticos en la transcripción de la misma (Masood y col., 1993). Al respecto se ha reportado una respuesta glial a la actividad neuronal, tanto en los niveles de mRNA como de la proteína de la GFAP, en el hipocampo después de las crisis inducidas eléctricamente; los autores sugieren que los cambios en la expresión genética de los astrocitos pudieran alterar la actividad homeostática de los mismos, lo que pudiera tener consecuencias importantes en el desarrollo del estado epiléptico (Torre y col., 1993). Finalmente, el uso de oligonucleótidos antisentido a c-fos para bloquear la expresión de la proteína c-fos podría bloquear los cambios isquémicos en genes con activación funcional de sus sitios AP-1 (Liu y col., 1994). Por ejemplo, se conoce que la expresión de GFAP es aumentada después del daño isquémico; demostrando que este aumento puede ser bloqueado por oligos antisentido a c-fos puede darnos una evidencia de que la inducción isquémica de c-fos media la inducción del gene GFAP (Liu y col., 1994).



**FIGURA 8.** Papel de las proteínas Fos y Jun en el acoplamiento estímulo-transcripción. Algunos estímulos extracelulares (factores de crecimiento, neurotransmisores o agentes que afectan los canales a calcio) generan la presencia de segundos mensajeros por la activación de cinasas (cinasas dependientes de cAMP, cinasas dependientes de calcio-calmodulina), esta señal genera la activación rápida transcripcional de *c-fos* y *c-jun*, así como de otros estrechamente relacionados a éstos. Estas proteínas pueden formar heterodímeros fos-jun que interactúan con la secuencia de DNA AP-1, regulando la transcripción de otros genes. Miembros de la familia jun también pueden unirse a la secuencia del DNA CRE. Tomada de Morgan, J. I. , 1991.

## 5.2. C-FOS Y EPILEPSIA

La excitación neuronal generada por las crisis inducidas experimentalmente provoca una inducción rápida de los IEGs, que participan en un control biológico fundamental de la regulación de la transcripción genética. Casi todos los tipos de crisis causan alteraciones dinámicas de la expresión de los IEGs en las neuronas del sistema límbico, pero también en áreas como la corteza, el estriado y el tálamo. Se puede considerar a los IEGs como un interruptor molecular que convierte la excitación epiléptica de corto término de las neuronas en alteraciones de fenotipo molecular (Kiessling y Gass, 1993). La expresión de la inmunoreactividad a c-fos se ha utilizado ampliamente como un marcador de la activación neuronal seguido de la inducción de las crisis en varios modelos de epilepsia experimental. Al respecto, la composición del complejo nucleoprotéico AP-1 (c-fos y c-jun) cambia con el tiempo después de las crisis como resultado de la presencia y ausencia secuencial de c-fos y proteínas relacionadas a c-fos (fosB, fra1, fra 2) (Sonnenberg y col., 1989b).

**TABLA 8. ANALISIS DE LA INDUCCION DE IEGs DESPUES DE CRISIS**

MODELO DE CRISIS	HIBRIDACION IN SITU	INMUNOCITOQUIMICA	REFERENCIA
PTZ	C-FOS	C-FOS	Morgan y col., 1987
PTZ	-	C-FOS	Dragunow y Roberts, 1987
PTZ	C-FOS, KROX-24, C-JUN, JUNB	-	Saffen y col., 1988
PTZ	C-FOS, C-JUN	C-FOS, FRA1, FRA2	Sonnenberg y col., 1989a
PTZ, KA, ELECTROSHOCK	C-FOS	C-FOS, FRA1, FRA2	Sonnenberg y col., 1989b
ELECTROSHOCK	C-FOS	-	Daval y col., 1989
ELECTROSHOCK	C-FOS, KROX-24, C-JUN, JUNB	-	Cole y col., 1990
ELECTROSHOCK	-	C-FOS, FOS B, KROX-24 C-JUN, JUN B, JUN D	Dragunow y col., 1992
BICUCULINA	-	C-FOS, FOS B, KROX-24 C-JUN, JUN B, JUN D	Gass y col., 1992

AC. KAINICO	-	C-FOS	Le Gal La Salle, 1988
AC. KAINICO	-	C-FOS	Popovici y col., 1990
AC. KAINICO	-	C-FOS, FOSB, KROX-20, KROX-24	Gass y col., 1993b
		C-JUN, JUN B, JUN D	
KINDLING 1987	-	C-FOS	Dragunow y Roberts,
KINDLING	C-FOS	-	Shin y col., 1990
KINDLING	C-FOS, C-JUN, KROX-24	-	Simonato y col., 1991
KINDLING	C-FOS	-	Clark y col., 1991

---

Tomada de Kiessling, M. y Gass, P., 1993.

En el modelo de crisis inducidas por pentilentetrazol (PTZ) se demostró por primera vez la inducción de c-fos en el cerebro de mamíferos in vivo (Morgan y col., 1987). La administración sistémica de PTZ o bicuculina a roedores genera crisis tónico-clónico generalizadas que son comparables a la epilepsia tipo gran mal en el humano (Dragunow y Roberts, 1987; Sonnenberg y col., 1989a). En estos modelos la expresión de c-fos aumenta rápidamente y alcanza los niveles más elevados a las 2 horas de la recuperación post-ictal para llegar a los niveles controles 8 horas después del término de las crisis; se ha observado la misma secuencia de inducción en las sub-regiones del hipocampo: el giro dentado, CA1 y CA3. Otras regiones donde se expresa son la corteza y varios núcleos talámicos (Morgan y col., 1987; Shehab y col., 1992; Yount y col., 1994).

La epilepsia parcial de origen temporolímbico es el tipo más intratable de la epilepsia humana. La administración del agonista glutamatérgico, ácido kaínico (KA) a ratas es un modelo que mimetiza este tipo de epilepsia (Ben-Ari y col., 1981). En este modelo se ha observado la expresión de c-fos en el hipocampo y áreas del sistema límbico asociadas (corteza piriforme, hipotálamo), para posteriormente presentarse en estructuras no límbicas; la expresión se correlaciona bien con la generación y propagación de la actividad paroxística producida por el KA. La secuencia de aparición en el hipocampo también es la misma que en el modelo anterior: giro dentado, CA1 y CA3. Los autores sugieren

que en esta area en particular, la inducción se debe a la activación de receptores AMPA y KA, ya que los antagonistas administrados al receptor NMDA no tuvieron ningún efecto. En otras areas como la corteza somatosensorial si es mediada por el receptor NMDA (Cass y col., 1993a; Woodburn y col., 1993).

En el modelo del kindling, que asemeja una epilepsia parcial compleja en el humano, se ha observado que una simple post-descarga evoca un aumento en la expresión de c-fos en el hipocampo; además se presenta el siguiente curso temporal para los IEGs en este modelo: Krox-24, c-fos, c-jun (Simonato y col., 1991). En el status epilepticus inducido por la administración de pilocarpina (agonista colinérgico) también se ha demostrado la expresión de c-fos en la corteza, hipocampo, corteza piriforme, amígdala, tubérculo olfatorio, estriado y ciertos núcleos talámicos de ratas tratadas. Esta expresión es bloqueada por los anticonvulsivantes diazepam (benzodiazepina) y MK-801 (antagonista al receptor NMDA) (Barone y col., 1993; Williams y Jope, 1994). Finalmente, también se presenta una correlación entre la expresión de c-fos y las crisis audiogénicas, aunque se limita a las regiones auditivas del cerebro: las cortezas externa y dorsal del colículo inferior (Simler y col., 1994; Snyder-Keller y Pierson, 1992).

Después de las crisis experimentales, la inducción de c-fos/c-jun precede a la "up-regulation" de genes que codifican al factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), pro-encefalina, NPY, GAD, acetil-colinesterasa y somatostatina (Bellman y col., 1991; Douglass y col., 1991; Dugich-Djordjevic y col., 1992; Feldblum y col., 1990; Gall y col., 1990; Green y col., 1989; Robbins y col., 1992); así como la "down-regulation" de la prodinorfina, un receptor al KA, y receptores a varios aminoácidos excitatorios e inhibitorios (Douglass y col., 1991; Gall y col., 1990; McDonald y col., 1991). Todos estos cambios de la expresión genética alteran los niveles de neuromoduladores, neurotransmisores y neurotrofinas, así como la sensibilidad de los receptores y proteínas estructurales o reguladoras de las sinapsis, que probablemente sean eventos del programa molecular dados por la plasticidad sináptica después de crisis repetitivas, que pudieran contrarrestar o contribuir al estado epiléptico (Kiessling y Cass, 1993).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el SAG, la interrupción de la infusión crónica de GABA (7 días) genera focos de actividad paroxística con duraciones de 3 a 5 días (Brailowsky y col., 1989). Trabajos recientes del Dr. Brailowsky y col. (datos no publicados) muestran la inducción rápida de un SAG en ratas que recibieron infusiones relativamente cortas de GABA (2 horas y 30 minutos), con una velocidad de flujo de  $3 \mu\text{l/hr}$  con una concentración de GABA de  $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Los mecanismos íntimos de regulación de la actividad paroxística generada en este modelo, probablemente se vean reflejados inicialmente a través de los IEGs (Immediate-early genes). El estudio de la expresión de c-fos sería un buen indicador de la activación neuronal relacionada a cambios plásticos de larga duración; además, c-fos está relacionado con la regulación de la expresión de genes específicos, como el de GFAP y GAD, entre otros, que probablemente sean de utilidad a la célula para contrarrestar la hiper-excitabilidad neuronal o establecer el fenómeno epiléptico. Por otra parte, el conocer la participación de alguna de las dos formas de la GAD (65 o 67), sería importante en la evaluación del mecanismo general que conlleva a la aparición, establecimiento o mantenimiento de focos epilépticos en este modelo en particular y, eventualmente en su control.

## **OBJETIVOS**

---

Los objetivos particulares del trabajo son los siguientes:

- 1. Evaluar si el SAG modifica la expresión de alguna de las dos formas de la GAD (GAD<sub>65</sub> o GAD<sub>67</sub>), examinada por técnicas de inmunocitoquímica.**
- 2. Evaluar la evolución temporal y la distribución espacial de la expresión de la proteína c-fos durante el SAG.**
- 3. Valorar los efectos neurogliales locales y a distancia del SAG, a través de la inmunocitoquímica para GFAP y tinción de Nissl.**

## MATERIALES Y METODOS

---

### INDUCCION DEL SAG

Para la inducción del SAG, se tomaron ratas de la cepa Wistar con un peso aproximado de 250 g. a las que se anestesió con halotano e implantó estereotáxicamente dos cánulas-electrodo de acero inoxidable de 0.5 mm de diámetro a nivel de la corteza motora (coordenadas: P 2.0, L 2.0, D 1.5, se utilizó Bregma como punto de referencia según atlas de (Paxinos y Watson, 1986). Después de un período post-operatorio de una semana, se procedió a la infusión unilateral de GABA (50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) con una bomba Harvard programable a un flujo constante de 3  $\mu\text{l}/\text{hr}$  por un tiempo de 2 horas. El GABA fué disuelto en una solución salina isotónica que contenía 0.2mg/ml del colorante azul directo 15, para determinar el sitio y ocurrencia de la infusión. Posteriormente se procedió al registro electroencefalográfico (EEG) hasta la aparición de la actividad epiléptica. Los animales que presentaron SAG se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital a diferentes tiempos (al término de la infusión de GABA, al inicio de la actividad epiléptica y 60 minutos post-SAG). Posteriormente se perfundieron por vía aorta ascendente con una solución de PBS (buffer de fosfatos de sodio salino 0.1M, pH 7.4, 250 ml) y de paraformaldehído al 4% en PB 0.1M. Se obtuvieron los cerebros y se mantuvieron en el fijador por 1 hora, para pasarlos a una solución crioprotectora de sacarosa al 20% en PBS 0.01M a 4°C durante 24 horas. Los animales controles recibieron unilateralmente solución salina al 0.9% (vehículo) con los mismos tiempos de sacrificio que los experimentales. Los cerebros se cortaron en rebanadas de 30  $\mu\text{m}$  en plano coronal en un criostato. Se colectaron las rebanadas flotantes y se conservaron a 4°C en buffer Tris 0.1M (pH 7.3).

### GRUPOS:

Los animales fueron divididos en 6 grupos diferentes: **a) los controles** a los cuales, se les infundió solución salina al 0.9% por 120 minutos y se les sacrificó a los siguientes tiempos: 1) post-infusión de la solución salina (n=3), 2) de acuerdo



a la latencia promedio del SAC n=3) y, 3) la latencia del SAC más 60 minutos (n=3). **b) los experimentales**, que recibieron GABA (50 µg/µl) y con tiempos de sacrificio de: 4) post-infusión de GABA (n=4), 5) inicio de la actividad epiléptica (en base a registros electroencefalográficos, n=5) y, 6) 60 minutos post-SAG (n=5). Además, se realizaron 8 grupos diferentes que por no haber confirmado la infusión y no tener los anticuerpos específicos, no fueron considerados en este trabajo. Los grupos fueron los siguientes: 7) animales "sham 1", con solo el anestésico que se utilizó (halotano); 8) animales "sham 2", con el anestésico y la implantación de las dos cánulas y los tres tornillos de registro epidurales; 9) animales con infusión de solución salina al 0.9% por 30 minutos y sacrificados: a) post-infusión de sol. salina y, b) de acuerdo a la latencia del SAC con este mismo tiempo de infusión; 10) animales con infusión de GABA por 30 minutos y sacrificados: a) post-infusión de GABA, b) 15 minutos después de la infusión de GABA, c) durante el inicio de las primeras espigas y, d) 60 minutos post-SAG.

**TABLA 9. GRUPOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO EXPERIMENTAL**

SACRIFICIO:	CONTROLES:	EXPERIMENTALES:
Post-infusión	0 min.	0 min.
Promedio latencia SAC	75.2 ± 11.9 min.	75.2 ± 11.9 min.
Promedio latencia SAC + 60 min.	80.0 ± 10.07 min.	80.0 ± 10.07 min.

#### **INMUNOCITOQUIMICA: GADs**

Para evaluar la expresión de las proteínas GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub> se utilizó el método de Esclapez, M. y col. (Esclapez y col., 1994).

#### **ANTICUERPOS:**

Para localizar la GAD<sub>67</sub> se utilizó el anticuerpo policlonal K2, descrito por Kaufman y col. (Kaufman y col., 1991). Es un anticuerpo generado en conejo después de la inyección de GAD<sub>67</sub> obtenida en un sistema de expresión

bacteriano de un cDNA-GAD felino clonado (Kaufman y col, 1986). Este anticuerpo reconoce a la GAD<sub>67</sub> de rata en Western blot (Kaufman y col., 1991). Para la GAD<sub>65</sub> se utilizó el anticuerpo monoclonal GAD-6 obtenido por Chang y Gottlieb (1988). Este anticuerpo se produjo en una línea hibridoma GAD-6 obtenida después de la inmunización de un ratón con GAD de cerebro de rata. Este anticuerpo reconoce a la GAD<sub>65</sub> de rata en Western blot (Chang y Gottlieb, 1988; Kaufman y col., 1991).

#### METODO EXPERIMENTAL:

Los cortes (30  $\mu$ m) se procesaron para localizar GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub> inmunocitoquímicamente con los anticuerpos GAD-6 y K2 no marcados respectivamente, para lo cual se utilizó el método de inmunomarcado de avidina-biotina estándar (Vectastain Elite ABC, Laboratorios Vector, Burlingame, CA.). Los cortes se enjuagan por 30 minutos en viales con una solución de buffer de fosfatos de potasio salino (KPBS) 0.02M (pH 7.4). Se incuban por 1 hora en agitación a temperatura ambiente con el mismo amortiguador y suero normal de cabra (NGS) dilución 1:30 (GAD<sub>67</sub>) o suero normal de caballo (NHS, GAD<sub>65</sub>). Después los cortes se incuban toda la noche (20 horas) a temperatura ambiente con el anticuerpo primario K2 (1:2000) o GAD-6 (1:100) diluidos en bufer KPBS 0.02 M y suero normal de cabra o de caballo al 1%. Los cortes se enjuagan por 30 minutos (2 cambios, uno cada 15 minutos) con KPBS en agitación, para transferirlos con el anticuerpo secundario 1:200 ("biotinylated goat anti-rabbit-GAD<sub>67</sub>", biotinilado de cabra anticonejo o "biotinylated horse anti-mouse-GAD<sub>65</sub>", biotinilado de caballo antiratón) en KPBS y NGS o NHS dilución 1:30, por 1 hora a temperatura ambiente y agitación. Se prepara 30 minutos antes una solución de avidina-biotina-peroxidasa en KPBS de acuerdo a la recomendaciones del fabricante. Se enjuagan los cortes como en los pasos anteriores y se incuban en la solución preparada por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Después se enjuagan por 30 minutos (2 cambios, uno cada 15 minutos) con PBS 0.075 M (pH 7.3). Se incuban por 15 minutos en diaminobencidina (DAB) al 0.06% y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.006% en PBS

0.075M. Se enjuagan los cortes por 30 minutos con PBS y se tratan en una solución de tetraóxido de osmio al 0.05% por 30 segundos. Posteriormente, se enjuagan los cortes por 15 minutos en PBS, para montarlos en laminillas cubiertas de gelatina, deshidratarlas y cubrirlas con Permount.

#### CONTROLES:

Para valorar si la técnica de inmunocitoquímica funcionaba, se llevaron a cabo experimentos pilotos con ratas normales y se compararon con las obtenidas por Esclapez y col. (Esclapez y col., 1994). Además, se consideraron 2 grupos controles, uno al que se eliminó el anticuerpo primario y se procesó normalmente y otro en que se eliminó el anticuerpo secundario. En ambos casos no se obtuvo inmunoreactividad a las GADs, como se esperaba.

#### INMUNOCITOQUIMICA: C-FOS

Para evaluar la expresión de la proteína c-fos se utilizó el método inmunocitoquímico adoptado por Jensen, F. E. y col. (Jensen y col., 1993). La técnica consiste en lavar los cortes 3 veces con PBS 0.01M y tritón al 0.1% (10 minutos cada lavado); para incubarlos en el medio bloqueante (PBS 0.01M, suero normal de conejo al 10% y tritón al 3%) por una hora a temperatura ambiente. Se lavan en PBS 0.01M y tritón al 0.1% por 5 minutos. Los cortes se incuban con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de oveja contra la oncoproteína c-fos (Cambridge Research Biochemicals, OA-11-825) dilución 1:1000 en PBSGT: PBS 0.01M, suero normal de conejo 1:100 y tritón al 0.3%; por 72 horas a 4°C. Se enjuagan con PBS 0.01M y tritón al 0.1% (10 minutos cada lavado) para transferirlos al anticuerpo secundario ("biotinylated rabbit anti-goat", biotinilado de conejo anti-cabra) dilución 1:200 en PBSGT durante 2 horas a temperatura ambiente. Se enjuagan como en los pasos anteriores y se incuban los cortes con una solución de avidina-biotina-peroxidasa (9 µl de avidina y 9 µl de biotina, centrifugar y ajustar volumen con el PBSGT) por 2 horas a temperatura ambiente. Se lavan los cortes nuevamente para incubarse con el buffer trizma 0.1M a pH de 7.2, diaminobencidina y peróxido de hidrógeno (0.006%) por 10

minutos. Se lavan 3 veces con PBS 0.01M (no necesita intensificación) . Los cortes se montan en laminillas cubiertas de gelatina, se deshidratan y se cubren con Permout.

#### CONTROLES:

Para valorar la técnica se procesaron algunos cortes de la misma manera pero sin el anticuerpo primario o secundario. Asimismo, se utilizaron cortes de cerebro de ratas que presentaron crisis tónico-clónicas generalizadas con PTZ, para verificar la inmunoreactividad de c-fos.

#### INMUNOCITOQUIMICA: GFAP

Para la valoración histológica de los cortes se llevó a cabo la técnica de inmunocitoquímica de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Sternberger, 1986) y la tinción de Nissl. La técnica de inmunocitoquímica consiste en términos generales en la incubación de los cortes en el anticuerpo primario (anti-GFAP, 1:2000) en PBSGT (PBS 0.1M, Tritón al 0.3% y NGS al 1%) por 72 horas a 4°C. Terminada la incubación se lavan 3 veces con PBS 0.1M durante 10 minutos cada lavado, para transferirlos al anticuerpo secundario ("biotinylated goat anti-rabbit", biotinilado de cabra anticonejo, dilución 1:200) en PBSGT por 2 horas a temperatura ambiente. Se lava como en los pasos anteriores y se coloca en una solución avidina-biotina peroxidasa (se prepara según las recomendaciones del fabricante) por 2 horas a temperatura ambiente. Se enjuagan los cortes nuevamente, para revelarse con DAB al 0.06% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.01% por unos minutos hasta que aparezca la reacción inespecífica. Se lavan los cortes por 30 minutos en PBS y se montan en laminillas para deshidratarlos y cubrirlos con Permout. Esta técnica es de uso frecuente en el laboratorio (Sternberger, 1986).

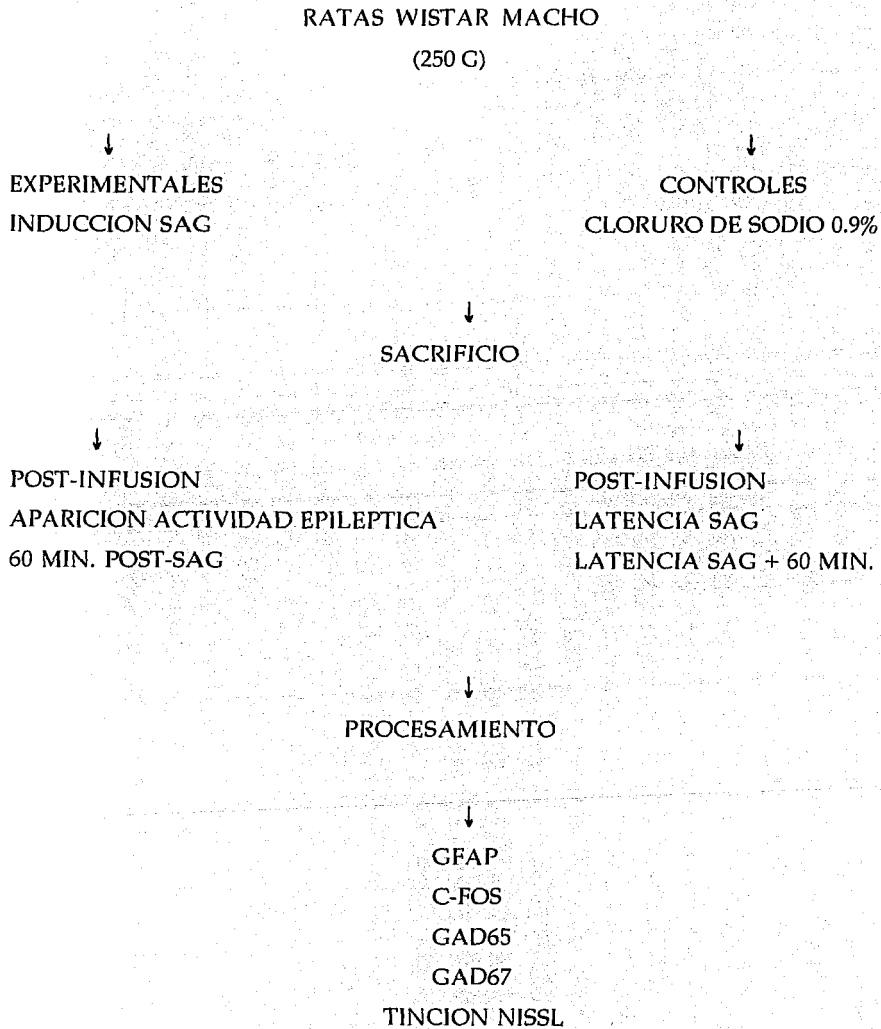
#### CONTEO CELULAR Y ESTADÍSTICA:

El número de células inmunoreactivas a c-fos, GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub> se determinó con la ayuda de un analizador de imágenes (MCID). Se cuantificaron 5 campos por cada región y por cada rata, con una área de 588  $\mu^2$  por campo en un

objetivo 20X (límites espaciales de muestreo). Para descartar ruido de fondo se consideraron los criterios de área promedio de la célula por contar, la densidad de gris de la célula con respecto al fondo y un "factor" de forma que determina el grado de redondez de la célula. Las regiones analizadas de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson fueron: corteza motora, corteza piriforme y amígdala, que fueron las regiones donde se pudo apreciar cambios en la expresión de estas proteínas. Los registros EEC se calificaron visualmente y se correlacionaron con la expresión de c-fos. Los datos del conteo celular se evaluaron a través de un ANOVA de dos factores completamente aleatorizados. Además se aplicó la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas. Se calculó el número de células inmunoreactivas por región en cada grupo, a partir del promedio de células que expresaron c-fos, GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub> de la n total de ratas de cada grupo (media y error estándar).

## DIAGRAMA EXPERIMENTAL

---



## RESULTADOS

---

### 1. REGISTRO ELECTROENCEFALOGRAFICO (EEG) DEL SAG

Los registros EEG de los grupos controles (con infusiones de solución salina 0.9%) bajo las tres condiciones antes mencionadas, mostraron una actividad eléctrica basal antes y después del tratamiento. Las ratas que presentaron SAG tuvieron descargas epilépticas focales que se iniciaron en la corteza motora infundida y se propagaron a la corteza motora contralateral. La latencia de aparición de las primeras espigas epilépticas fué de  $75.2 \pm 11.9$  minutos en el grupo de sacrificio al inicio de la actividad epiléptica y de  $80.0 \pm 10.07$  minutos en el grupo sacrificado 60 minutos post-SAG. El patrón predominante fué el 1, aunque en el último grupo se presentaron también los patrones 2 y 3. En la figura 9 se muestran los registros representativos de cada uno de estos grupos (los registros se hicieron antes y después del tratamiento para cada una de las ratas).

### 2. EXPRESION DE C-FOS

#### A) CONTROLES DE LA TECNICA

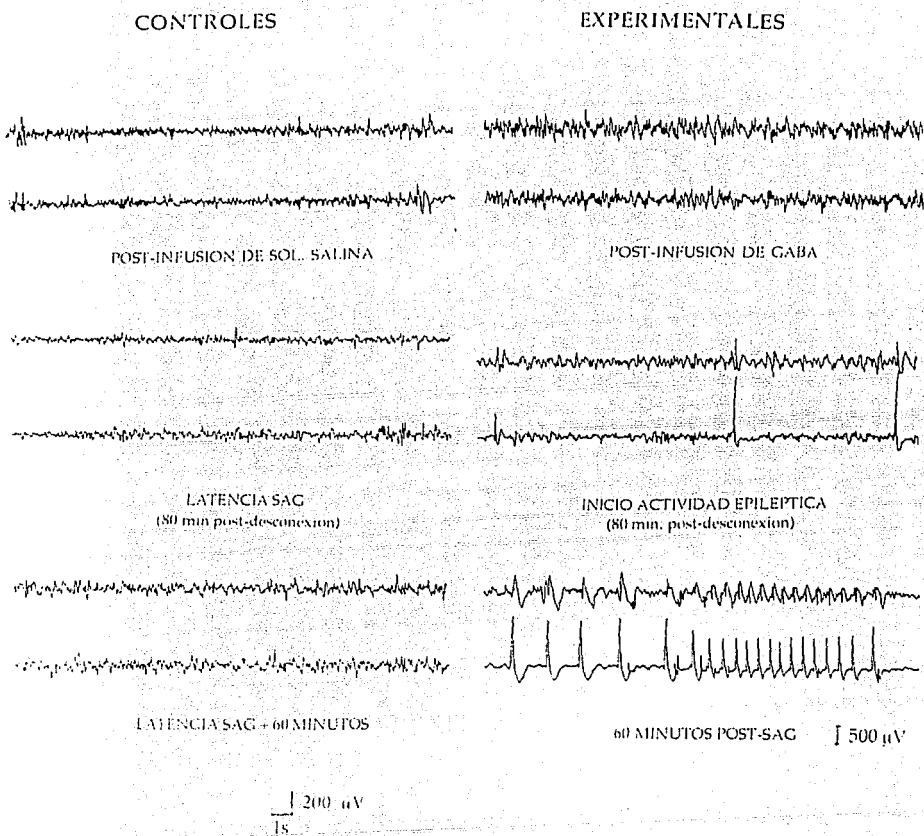
La rata a la que se le administró i.p. PTZ (65mg/Kg), presentó movimientos masticatorios, crisis tónico-clónicas generalizadas con pérdida de la postura y una latencia de aparición de las crisis de entre 1 a 2 minutos. En este modelo se pudo apreciar (como lo muestra la figura 10) un aumento en las células inmunoreactivas (IR) a c-fos en las siguientes regiones: corteza piriforme, corteza del cíngulo parasagital, hipocampo, hipotálamo y amígdala, con respecto al control, que recibió sólo el vehículo (solución salina al 0.9%) por vía i.p.; todas estas regiones están relacionadas con la actividad epileptiforme en este modelo (sistema límbico). Los resultados confirman los trabajos previos de Morgan y col. (1987), Shehab y col. (1992) y, Jensen y col. (1993) (Jensen y col., 1993; Morgan y col., 1987; Shehab y col., 1992).

Los grupos controles a los que se les eliminó el anticuerpo primario o secundario del procesamiento normal de los tejidos, no presentaron marca alguna o IR-C-fos.

#### **B) GRUPOS TRATADOS**

La expresión de la proteína c-fos se ve claramente aumentada en la corteza motora de los grupos experimentales 4 y 5 (al término de la infusión de GABA y al inicio de la actividad epileptiforme) con respecto a sus controles , con una significancia según la prueba de Tukey de  $p < 0.01$  (ver la tabla 10). El grupo experimental 6 (sacrificado 60 minutos post-SAG) no muestra diferencias con respecto al grupo control 3. En la corteza piriforme se presentó un aumento significativo en el número de células IR-C-fos (prueba Tukey con  $p < 0.01$ ) en el grupo experimental 5 con respecto al grupo control 2. Los otros dos grupos experimentales (4 y 6) no presentaron diferencias con respecto a sus controles (ver figuras 11, 12 y 13). En otras regiones del cerebro no se apreciaron cambios en la expresión de c-fos según las evaluaciones visuales de los cortes.





**FIGURA 9.** Registros EEGs representativos obtenidos de ratas que presentaron el Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG). Los registros comprenden la región entre la cánula de infusión y el tornillo epidural. Trazo superior: corteza motora izquierda. Trazo inferior: corteza motora derecha. Los controles son ratas con infusión de solución salina al 0.9% y los experimentales con infusión de GABA.

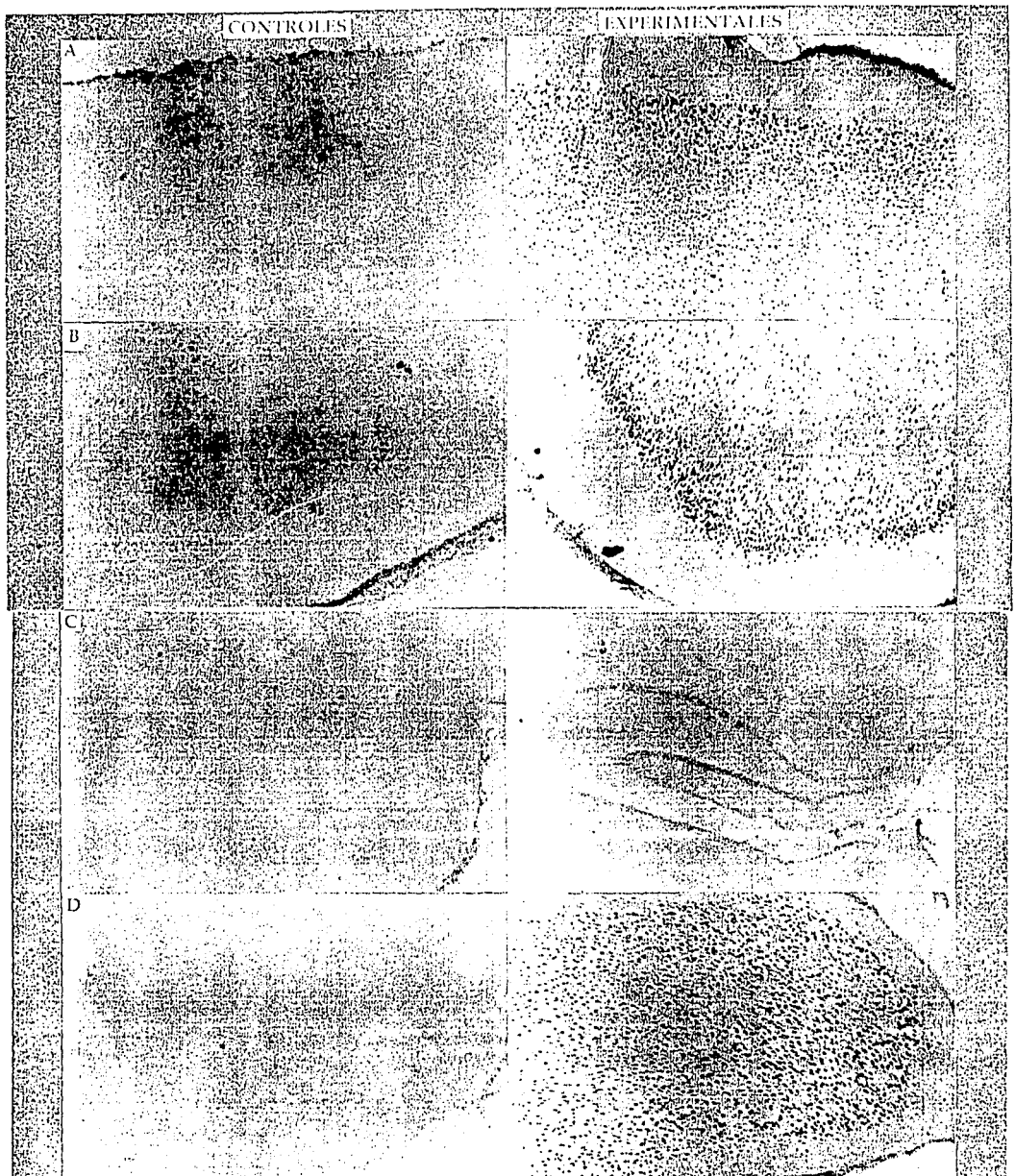


FIGURA 10. Controles de la Técnica Inmunocitoquímica a c-fos. Expresión de la proteína c-fos en ratas que recibieron por vía i.p. solución salina al 0.9% (controles) y PTZ. (65mg/Kg, experimentales). En este modelo de crisis tónico clónicas se pudo apreciar un aumento de células IR-c-fos en la regiones de: A) la corteza del cíngulo parasagital, B) la corteza piriforme, C) el hipocampo y, D) la amígdala, con respecto a los controles. Los resultados confirman los trabajos previos de Morgan y col., 1987; Shehab y col., 1992 y, Jensen y col., 1993. Barra de calibración=250  $\mu$ m.

**TABLA NO. 10. NUMERO DE CELULAS INMUNOREACTIVAS A LA PROTEINA C-FOS (  $\bar{X} \pm ES$  ), EN LA CORTEZA MOTORA Y CORTEZA PIRIFORME DE LOS DIFERENTES GRUPOS CONTROLES Y EXPERIMENTALES**

---

**1. CORTEZA MOTORA**

GRUPOS CONTROLES:

POST-INFUSION	40.85 $\pm$ 3.42
LATENCIA SAG	28.60 $\pm$ 3.10
LAT. SAG + 60 MINUTOS	17.90 $\pm$ 1.61

GRUPOS EXPERIMENTALES:

POST-INFUSION	65 $\pm$ 4.21*
INICIO ACTIVIDAD EPILEPTICA	75.20 $\pm$ 7.3*
60 MINUTOS POST-SAG	33.48 $\pm$ 3.85

**2. CORTEZA PIRIFORME**

GRUPOS CONTROLES:

POST-INFUSION	40 $\pm$ 2.16
LATENCIA SAG	21.09 $\pm$ 2.32
LAT. SAG + 60 MINUTOS	26.66 $\pm$ 2.08

GRUPOS EXPERIMENTALES:

POST-INFUSION	30.35 $\pm$ 2.93
INICIO ACTIVIDAD EPILEPTICA	71.92 $\pm$ 6.54*
60 MINUTOS POST-SAG	18.20 $\pm$ 2.11

---

\*p<0.01

### **C) CORRELACION EEG**

No se encontró una clara correlación entre la actividad EEG y la expresión de c-fos en los grupos con SAC (Inicio de la actividad epiléptica y 60 minutos post-SAC). La mayoría de los animales que presentaron una propagación de la actividad epiléptica al otro hemisferio no muestran inmunoreactividad en la corteza motora (grupo 60 minutos post-SAC) y la corteza piriforme de ambos hemisferios (grupo inicio de la actividad epiléptica). Con respecto a los patrones EEG de los grupos, tampoco se observó ninguna correlación.

### **3. EXPRESION DE LAS GADs**

#### **A) GAD<sub>67</sub>**

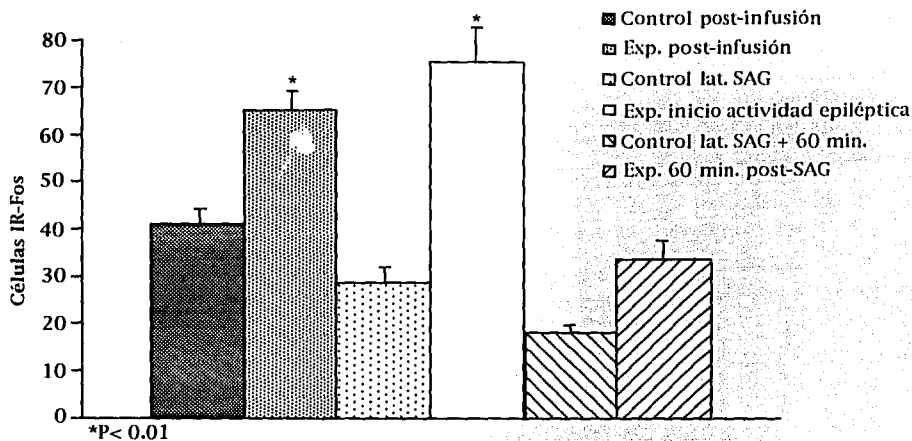
Los cortes parasagitales de cerebelo de una rata normal sin tratamiento, a los que se procesó para verificación de la técnica, muestran una gran similitud con los reportados por Esclapez y col. (Esclapez y col., 1994); en ambos casos se pueden apreciar los somas y dendritas proximales de las células de Purkinje de la corteza cerebelosa, así como los somas de las células en canasta de la capa molecular y de las células de Golgi en la capa granular (ver la figura 14).

La expresión de la proteína GAD<sub>67</sub> no presentó cambios significativos en la región de la amígdala en ningún grupo experimental con respecto a sus controles. En la región de la corteza motora sólo se apreciaron diferencias significativas en el grupo experimental sacrificado 60 minutos post-SAC donde se observa una ligera disminución en las células IR- GAD<sub>67</sub> con respecto a su control (ver la tabla 11 y las figuras 15 y 16).

#### **B) GAD<sub>65</sub>**

Los cortes de la rata normal, para verificar la técnica con el anticuerpo a la GAD<sub>65</sub>, muestran claramente la presencia de la proteína en los somas de las células de Purkinje (aunque no tan definidos como para la GAD<sub>67</sub>), y terminales de alrededor de estos mismos somas, tal como se observa en otros trabajos (Esclapez y col., 1994) (ver la figura 14).

### EXPRESION DE C-FOS EN CORTEZA MOTORA



### EXPRESION DE C-FOS EN CORTEZA PIRIFORME

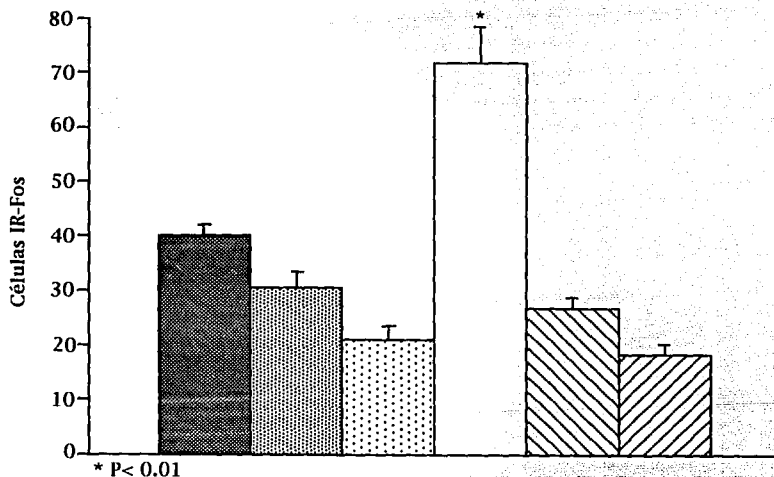


FIGURA 11. Las gráficas muestran un aumento en el número de células IR-fos en los grupos experimentales: post-infusión de GABA y al inicio de la actividad epiléptica en la corteza motora y este último también en la corteza piriforme, con respecto a sus controles de acuerdo a la prueba de Tukey.

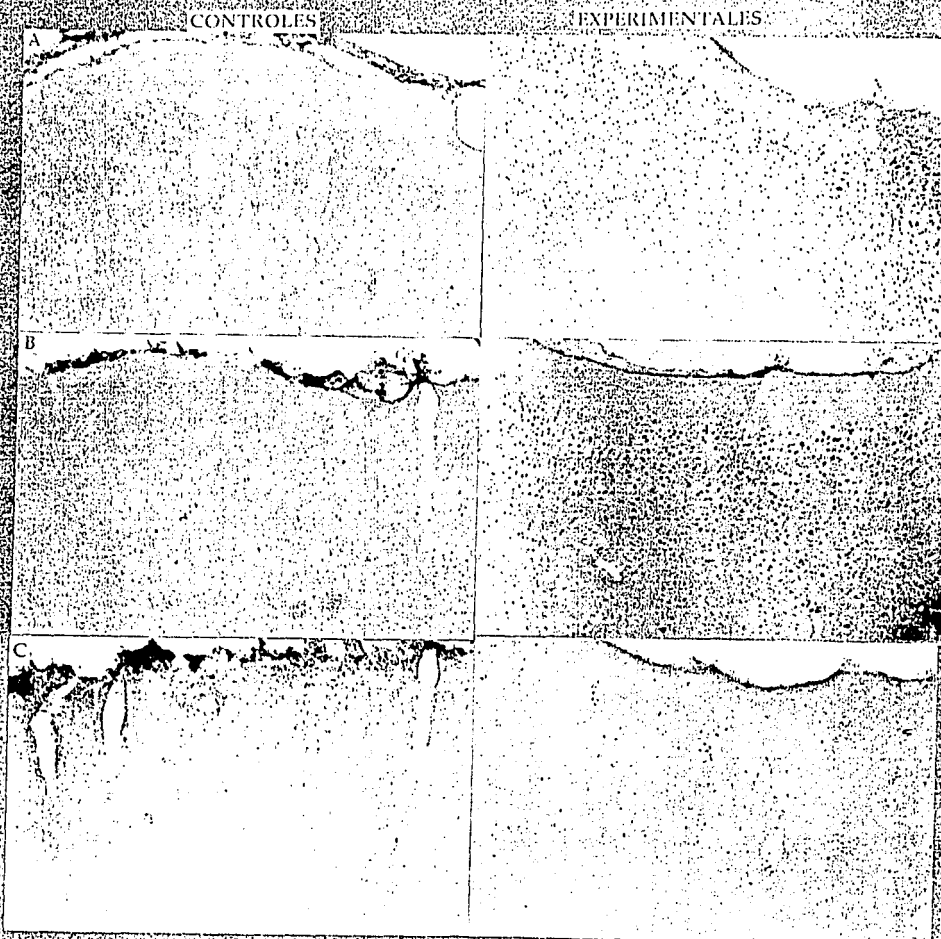


FIGURA 12. Expresión de la proteína c-fos a nivel de la Corteza Motora. En la figura se observa un aumento en la expresión de c-fos, en los grupos tratados con infusiones de GABA (50µg/µl) y sacrificados: A) al término de la infusión de GABA (0 minutos) y, B) al inicio de la actividad epiléptica (75.2 ± 11.9 minutos) con respecto a los controles que solo recibieron solución salina al 0.9% y se sacrificaron a los mismos tiempos. C) El grupo sacrificado 60 minutos post-SAC no muestra diferencias con respecto a su grupo control (80.0 ± 10.07 minutos). Barra de calibración: 250 µm.

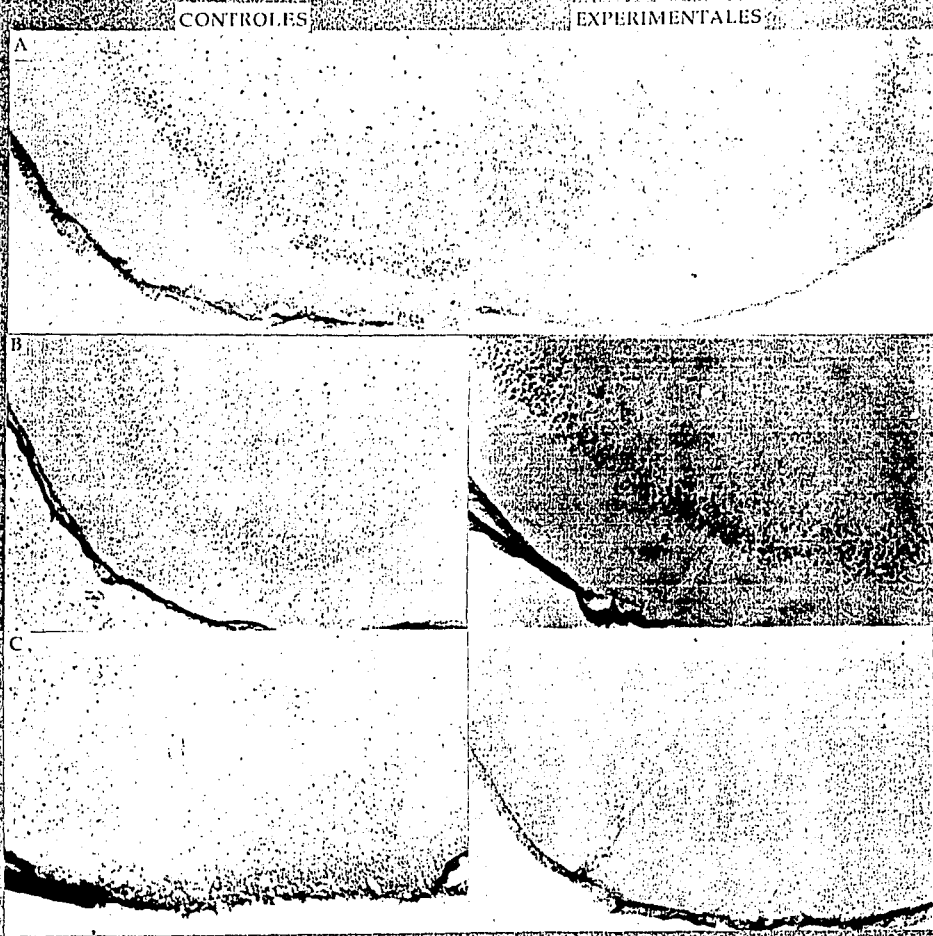


FIGURA 13. Expresión de la proteína c-fos a nivel de la Corteza Piriforme. En esta región se observa un aumento en la expresión de c-fos solo en el grupo experimental sacrificado al inicio de la actividad epiléptica (B) con respecto a su control. En los grupos sacrificados post-infusión de GABA y salina (A) así como a los 60 minutos post SAG y de acuerdo a la latencia del SAG + 60 minutos (C) no se presentaron diferencias. Barra de calibración=250  $\mu$ m.

No se presentan cambios (no hay diferencias significativas) en la expresión de la proteína GAD<sub>65</sub> en los grupos controles y experimentales en las regiones de la amígdala y la corteza motora (ver la tabla 12 y las fig. 17 y 18).

**TABLA 11. CELULAS INMUNOREACTIVAS A LA GAD 67 EN LA AMIGDALA Y LA CORTEZA MOTORA (X ± ES), DE RATAS CONTROLES Y EXPERIMENTALES**

**1. AMIGDALA**

GRUPOS CONTROLES:

LATENCIA SAG	23.04 ± 2.64
LAT. SAG + 60 MINUTOS	33.26 ± 2.45

GRUPOS EXPERIMENTALES:

INICIO ACTIVIDAD EPILEPTICA	32.69 ± 4.55
60 MINUTOS POST-SAG	25.14 ± 2.35

**2. CORTEZA MOTORA**

GRUPOS CONTROLES:

LATENCIA SAG	29.81 ± 2.25
LAT. SAG + 60 MINUTOS	35.15 ± 2.43

GRUPOS EXPERIMENTALES:

INICIO ACTIVIDAD EPILEPTICA	30.30 ± 2.38
60 MINUTOS POST-SAG	24.81 ± 2.19*

---

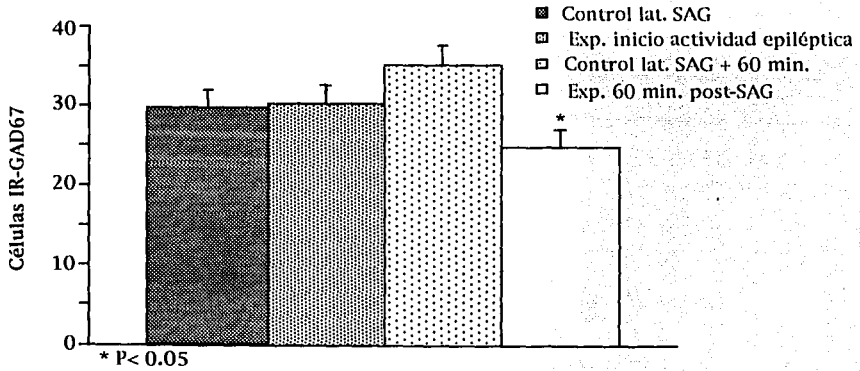
\*P<0.05





FIGURA 14. Controles de la Técnica Inmunocitoquímica para las GADs. En la figura se observa cortes parasagitales de cerebelo a los que se procesó para la verificación de la técnica, de acuerdo al método de Esclapez y col., 1994. A) Aquí se puede apreciar claramente los somas y dendritas proximales de las células de Purkinje de la corteza cerebelosa con el anticuerpo a la GAD67 (K2). B) Con el anticuerpo para la GAD 65 (GAD-6) se observan los somas no tan definidos de las células de Purkinje así como las terminales de alrededor de estos somas. Barra de calibración=250 $\mu$ m.

EXPRESION DE GAD67 EN  
CORTEZA MOTORA



EXPRESION DE GAD67 EN  
AMIGDALA

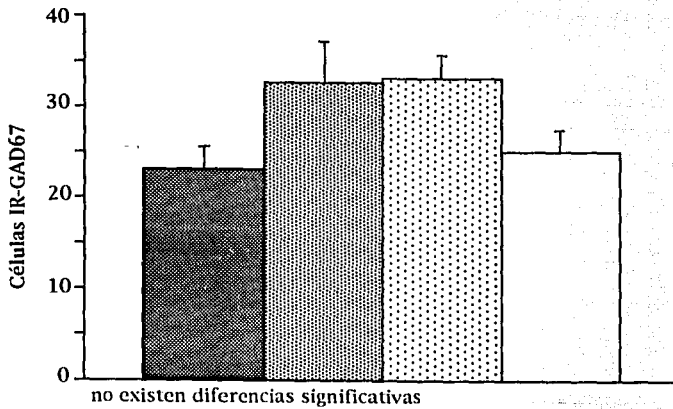


FIGURA 15. En esta figura se observa una disminución en el número de células IR-GAD67 sólo en la corteza motora del grupo sacrificado 60 min. post-SAG con respecto al control, según la prueba de Tukey.

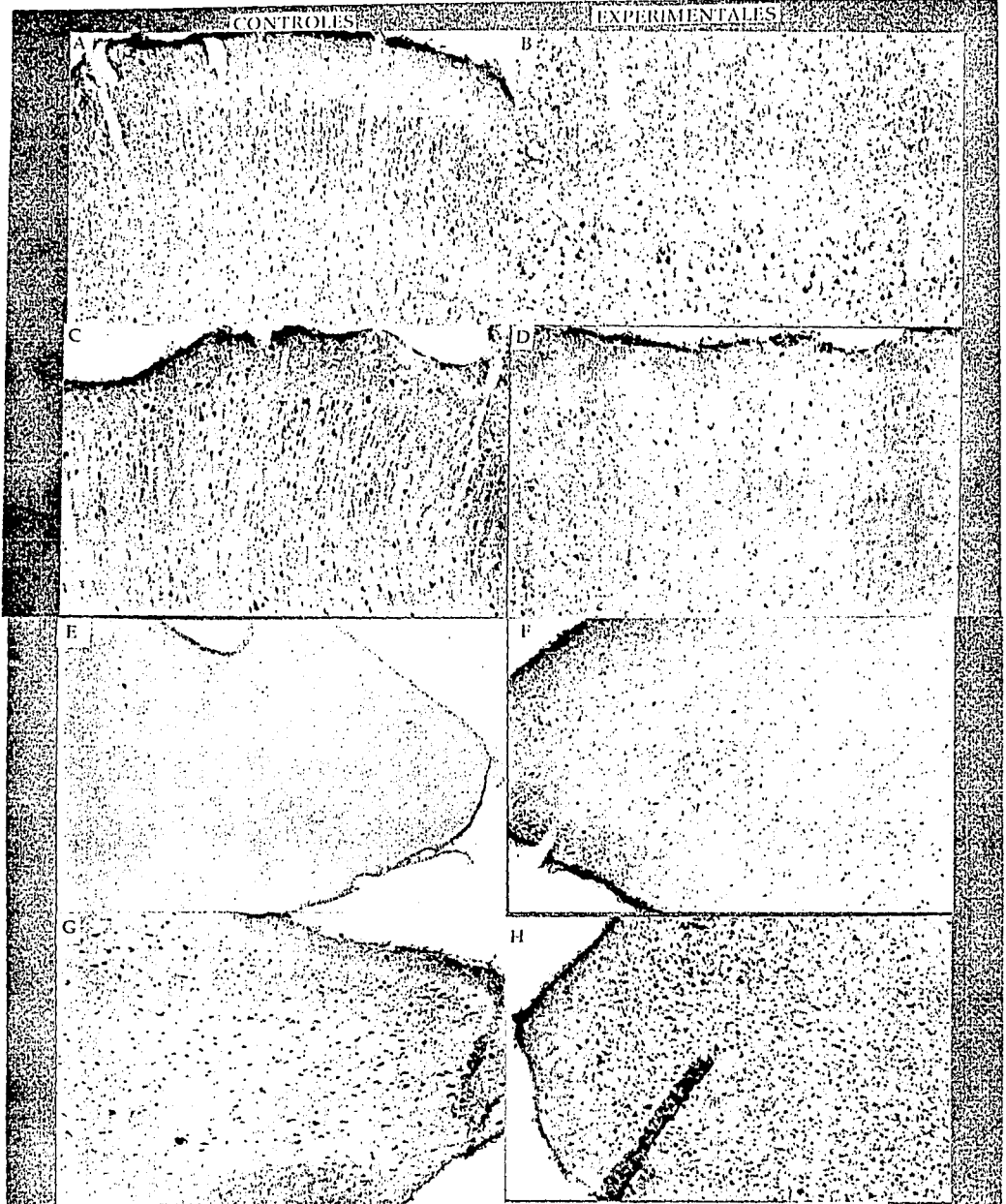


FIGURA 16. Expresión de la proteína GAD67. En la región de la corteza motora (A,B,C y D) se observa una ligera disminución en las células IR-GAD67 en el grupo sacrificado 60 minutos post-SAG con respecto al control (C,D). Los grupos sacrificados al inicio de la actividad epiléptica y de acuerdo a la latencia de aparición del SAG no presentaron cambios significativos (A,B). En la región de la amígdala (E,F,G y H) no se observaron diferencias en estos mismos grupos. Barra de calibración=250  $\mu$ m.

**TABLA 12.** CELULAS INMUNOREACTIVAS A LA GAD 65 ( $X \pm ES$ ), EN LA AMIGDALA Y LA CORTEZA MOTORA DE LOS GRUPOS CONTROLES Y EXPERIMENTALES

---

### 1. AMIGDALA

#### GRUPOS CONTROLES:

LATENCIA SAG	$22 \pm 2.17$
LAT. SAG + 60 MINUTOS	$17.06 \pm 1.55$

#### GRUPOS EXPERIMENTALES:

INICIO ACTIVIDAD EPILEPTICA	$17.76 \pm 2.20$
60 MINUTOS POST-SAG	$12.63 \pm 1.46$

### 2. CORTEZA MOTORA

#### GRUPOS CONTROLES:

LATENCIA SAG	$31.50 \pm 4.18$
LAT. SAG + 60 MINUTOS	$22.66 \pm 2.84$

#### GRUPOS EXPERIMENTALES:

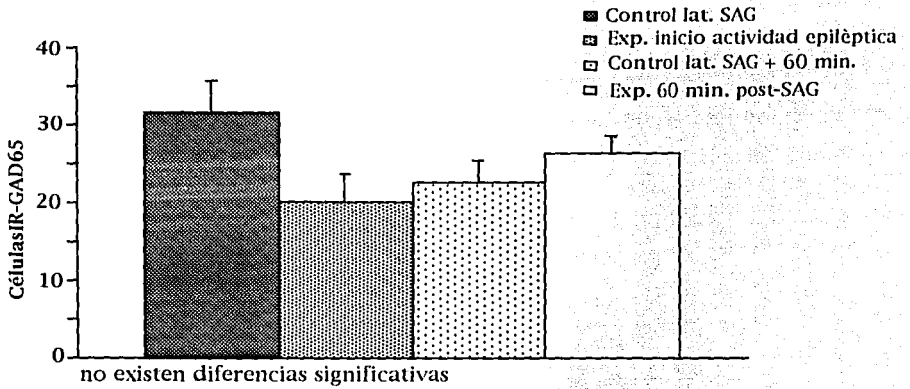
INICIO ACTIVIDAD EPILEPTICA	$20.16 \pm 3.52$
60 MINUTOS POST-SAG	$26.45 \pm 2.17$

---

### 4. EXPRESION DE GFAP

Los resultados muestran gliosis reactiva en la zona de colocación de las cánulas (corteza motora de ambos hemisferios) en los grupos controles como los experimentales, con un ligero aumento en la zona de infusión del GABA. En algunos casos también se observa inmunoreactividad en la región del hipocampo. En ninguna otra región se observan cambios en la expresión de esta proteína (ver la figura 19).

### EXPRESION DE GAD65 EN CORTEZA MOTORA



### EXPRESION DE GAD65 EN AMIGDALA

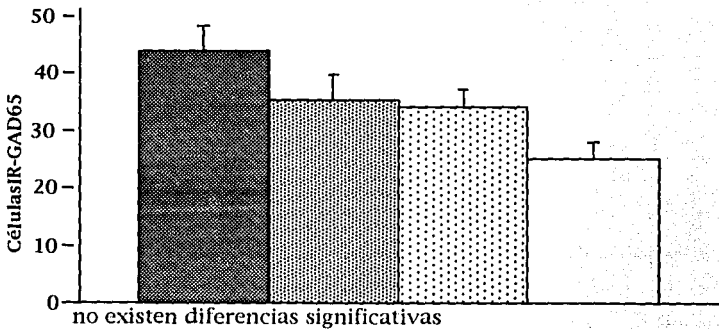


FIGURA 17. En las gráficas se observa que no existen diferencias significativas en la expresión de la GAD65 en los grupos experimentales y controles, según la prueba de Tukey.

CONTROLES

EXPERIMENTALES

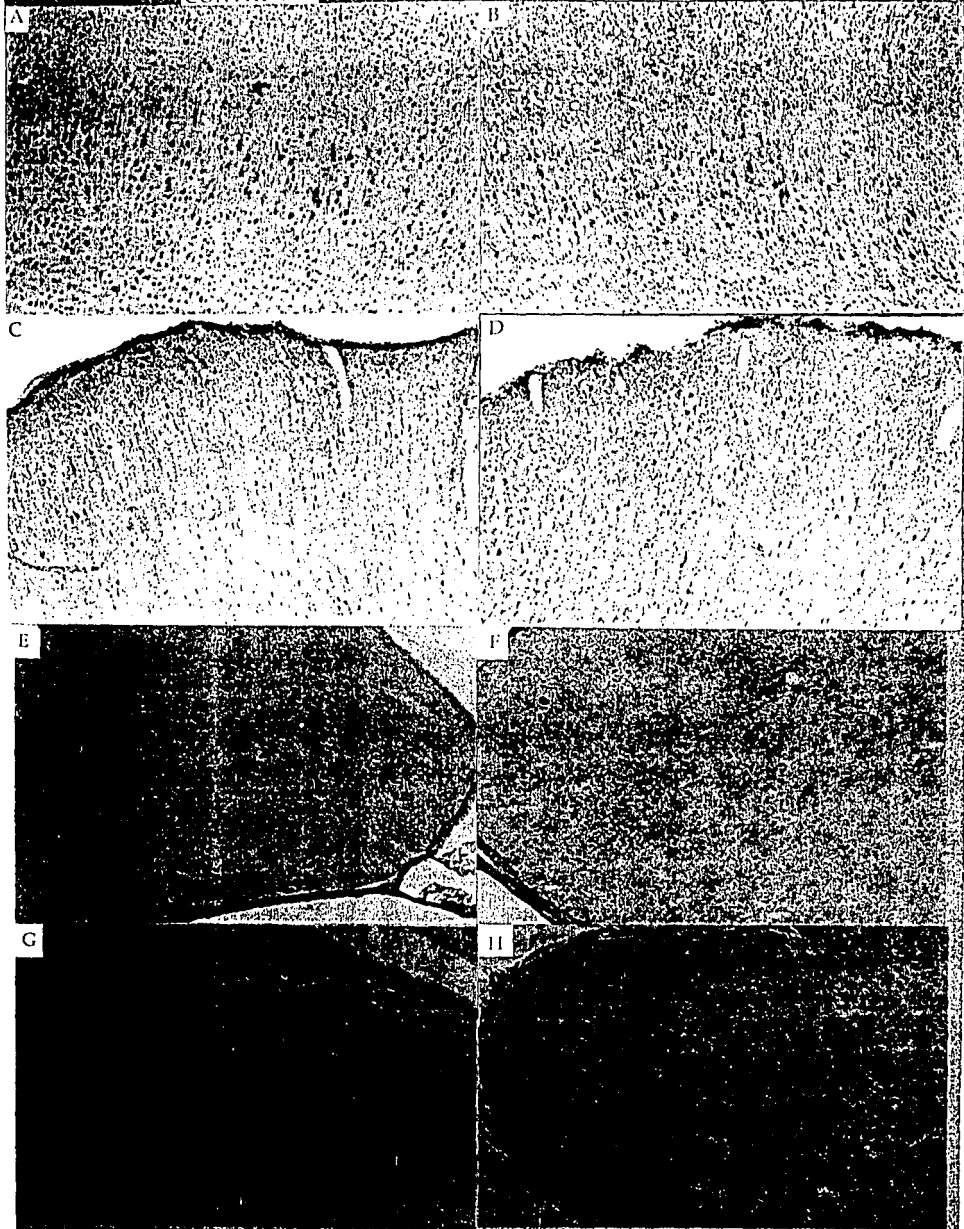


FIGURA 18. Expresión de la proteína GAD65. En la región de la corteza motora (A,B,C y D) y de la amígdala (E,F,G y H) no se observaron diferencias en la expresión de esta proteína en ninguno de los grupos controles sacrificados de acuerdo a la latencia del SAG (A y E) y la latencia del SAG + 60 minutos (C y G) así como los experimentales sacrificados al inicio de la actividad epiléptica (B y F) y post-SAG (D y H). Barra de calibración=250  $\mu$ m.

CONTROLES

EXPERIMENTALES



FIGURA 19. Expresión de la proteína GFAP. En la figura se observa que en todos los grupos controles y experimentales se presenta IR-GFAP en la corteza de ambos hemisferios, donde han sido colocadas las cánulas de infusión y con un ligero aumento en la zona de infusión del GABA. A) grupos sacrificados post-infusión de salina y GABA, B) sacrificados de acuerdo a la latencia del SAG e inicio de la actividad epiléptica ( $75.2 \pm 11.9$  minutos), C) sacrificados de acuerdo a la latencia del SAG + 60 minutos y post-SAG. Barra de calibración = 500  $\mu$ m.

## DISCUSION

---

### EXPRESION DE C-FOS EN EL SAG:

Los resultados de este estudio muestran que existe un aumento significativo en el número de células IR-fos en la corteza motora de las ratas sacrificadas post-infusión de GABA y durante el inicio de la actividad epiléptica con respecto a los controles (ver la tabla 10). En cambio, para el grupo sacrificado 60 minutos post-SAG no se observaron diferencias significativas con respecto al control. A nivel de la corteza piriforme se presentó un aumento de células IR-fos en el grupo sacrificado al inicio de la actividad epiléptica con respecto al control. El resto de los grupos no presentó diferencias significativas. Existe un gran número de evidencias que reportan la expresión del mRNA para c-fos después de varios tipos de lesiones focales (corticales y a nivel de hipocampo-estriado) y en transplantes de animales con lesión a nivel de la corteza por excitotoxinas (Honkanieni y col., 1992; Kohmura y col., 1995; Schulz y col., 1994). Para el caso del SAG donde se presenta lesión a nivel de la corteza motora por la colocación de cánulas, los efectos por la lesión no se observan como en los trabajos anteriores ya que los animales se sacrifican una semana después de la recuperación post-operatoria y no después de algunas horas post-lesión.

También se ha reportado la inducción rápida y transitoria del mRNA y de la proteína a c-fos en una gran variedad de modelos de epilepsia experimental con un patrón espacio-temporal específico para cada uno de ellos. Se ha investigado en las crisis inducidas por bicuculina, NMDA, pilocarpina, ácido kaínico, pentilentetrazol, en las crisis audiogénicas, en la cepa E1 de ratón y con electroshock máximo (Barone y col., 1993; Dave y Tortella, 1994; Gass y col., 1992; Gass y col., 1993b; Herdegen y col., 1993; Morgan y col., 1987; Murashima y col., 1994; Shehab y col., 1992; Simler y col., 1994; Snyder-Keller y Pierson, 1992; Williams y Jope, 1994; Yount y col., 1994). En todos ellos se plantea la hipótesis de que la expresión de los genes inmediatos tempranos o IEGs como c-fos pudieran facilitar la conductividad sináptica la cual probablemente participe en la



formación del fenómeno de plasticidad anormal (formación de nuevos contactos sinápticos, circuitos o redes neuronales con una fisiología anormal) y la epileptogénesis.

**TABLA 13. COMPARACION DE LA EXPRESION DE C-FOS EN DIFERENTES MODELOS DE EPILEPSIA EXPERIMENTAL.**

MODELO:	TIEMPO IR-PICO:	REGION:	EXPRESION:	REFERENCIA:
Bicuculina	2horas	Giro dentado, CA1	Proteína	(Gass y col., 1992)
Bicuculina	4horas	CA3	Proteína	(Gass y col., 1992)
Crisis Audiogénicas	—	Núcleos subcorticales auditivos	Proteína	(Simler y col., 1994)
Crisis Audiogénicas "kindleadas"	—	Amígdala, Cx. piriforme hipocampo, neocorteza	Proteína	(Simler y col., 1994)
Electroshock máximo	2horas	Amígdala, n.hipotalámico ventromedial, área peripe- duncular, pre-tectum, colí- culo superior	Proteína	(Shehab y col., 1992)
KA 1994)	6horas	Hipocampo, Cx. endorinal Cx. sensorial	mRNA	(Kaminska y col., 1994)
Metrazol 1989a)	30minutos	Extractos nucleares de cerebro	mRNA	(Sonnenberg y col., 1989a)
Metrazol	90minutos	Giro dentado, Cx.piriforme Cx. del cíngulo	Proteína	(Morgan y col., 1987)
NMDA	30minutos	Cerebelo (i.c.v.)	Proteína	(Dave y Tortella, 1994)

		Cx. cerebral (i.v.)	Proteína
Pilocarpina	2horas	Cx. piriforme, Amígdala	Proteína (Barone y col., 1993)
(crisis focales)		Tubérculo olfatorio	
Pilocarpina	2horas	Hipocampo, Cx. cíngulo	Proteína (Barone y col., 1993)
(crisis generalizadas)		Cx. frontal, estriado, Tálamo	
		(núcleos paraventricular, reticular y centromedial)	
Ratón E1	30minutos	Giro dentado, CA1, Cx. parietal	mRNA (Murashima y col., 1994)

Se ha sugerido que c-fos juega un papel como marcador funcional de la integración de la activación genómica y los sistemas de transducción de señales moleculares (acoplamiento estímulo-transducción). Además, se conoce que el factor de transcripción AP-1, formado por miembros de la familia fos y jun, juega un papel importante en la inducción (up-regulation) o bloqueo (down-regulation) de la expresión de genes secundarios que pudieran participar en el fenómeno epiléptico (Kiessling y Gass, 1993). Las evidencias de los cursos temporales de la expresión de los diferentes IEGs fuertemente sugieren que a diferentes tiempos la composición del factor de transcripción AP-1 cambia después de las crisis (Gass y col., 1992; Kaminska y col., 1994; Sonnenberg y col., 1989a). La composición de los dímeros fos/jun esta determinada por la disponibilidad de los diferentes componentes que conforman estas dos familias. En la mayoría de los modelos de crisis, la inducción rápida de c-fos determina que los heterodímeros en el periodo de recuperación postictal esten compuestos de c-fos y una de las proteínas rápidamente sintetizadas de la familia Jun (c-jun, jun B) (Kiessling y Gass, 1993).

De acuerdo a estos antecedentes, la expresión de la proteína a c-fos también se observa en el SAG en particular con un patrón espacio-temporal bien definido. La inducción de c-fos se observa sólo después de las infusiones de 120 minutos con GABA y durante el inicio de la actividad epiléptica en la corteza motora donde se lleva a cabo esta infusión, para desaparecer por completo 60 minutos

después del inicio del SAG. En la corteza piriforme la expresión sólo se presenta durante el inicio de la actividad epiléptica, lo que indicaría una expresión diferencial en las regiones de la corteza motora y piriforme. En otras regiones del cerebro no se observaron diferencias a nivel cualitativo, por lo que no se hizo el conteo celular de estas regiones. En otro estudio se ha reportado que existen diferencias en la IR-c-fos de acuerdo a la edad y al modo de inducción de las crisis. Por ejemplo, en las ratas adultas se presenta IR en las capas superficiales y en las ratas con la edad de P10 la IR se confina a las capas profundas. Asimismo, es mayor la IR en el giro dentado y el hipocampo cuando las crisis son más prolongadas en ratas inmaduras (p10) como adultas y el curso temporal de la expresión de c-fos con mayor tiempo de expresión en las ratas inmaduras (Jensen y col., 1993). Podemos considerar de acuerdo a todos los antecedentes señalados que la expresión de la proteína a c-fos en este modelo nos indicaría el momento en el cual se lleva a cabo la integración de los procesos de acoplamiento de la activación genómica con el sistema de transducción de señales moleculares, para generar los cambios en la síntesis de productos de genes secundarios que faciliten el fenómeno epileptogénico aquí descrito.

Por otro lado, aunque existen reportes de que en la gran parte de los tipos de crisis se presentan alteraciones en la expresión de los IEGs en las neuronas del sistema límbico y también en áreas no límbicas como la corteza, el estriado y el tálamo; en el SAG en cambio, sólo se presenta la expresión de c-fos en la corteza motora que es una estructura no límbica y en la corteza piriforme del sistema límbico, pero en ninguna otra estructura que pertenezca a este sistema. Se ha reportado, que en el modelo de crisis límbicas inducidas por KA, la secuencia de activación genómica progresa del hipocampo a áreas asociadas del sistema límbico y subsecuentemente a estructuras no límbicas, lo que se correlaciona bien con la generación y propagación de la actividad paroxística (Gass y col., 1993b); sin embargo en el SAG la expresión de c-fos se presenta sólo en la región infundida de la corteza motora y posteriormente en la corteza piriforme durante el inicio de la actividad paroxística, lo que nos llevaría a pensar si la activación neuronal en estas áreas realmente tenga que ver con la generación y propagación de la

actividad en el SAG. Además, en este trabajo también se correlacionó la expresión de c-fos con respecto a la actividad paroxística y su propagación, así como los diferentes patrones que se presentan durante el SAG. Los resultados muestran sin embargo que no existe una clara correlación entre la expresión de la proteína c-fos y la actividad EEG, ya que ratas que presentaron propagación de la actividad paroxística al hemisferio contralateral no presentaron expresión de c-fos en la corteza motora o piriforme de ambos hemisferios. Asimismo, en las ratas en los que los patrones que más se presentaron fueron el 1 y 2 no mostraron diferencias con las ratas que presentaron además del patrón 1 y 2, el patrón 3. Todo esto nos hace pensar, que la expresión de c-fos en el SAG nos mostraría más precisamente el momento de la activación genómica de la neurona para generar el ambiente molecular adecuado para inducir el fenómeno epiléptico a través de la expresión de otros genes secundarios y que el primer sitio donde se presenta, es en la propia corteza motora donde se llevó a cabo la infusión incluso antes de que aparezcan las primeras espigas de la actividad paroxística, probablemente como primer signo de cambio plástico previo a la epileptogénesis. Una vez iniciado el SAG se presentaría este fenómeno a nivel de la corteza piriforme a través del núcleo talámico dorsomedial o de las fibras de asociación intrahemisféricas que van del lóbulo temporal a la corteza del lóbulo frontal (Barr, M., 1979), aunque no se pudo apreciar IR-c-fos en estas regiones a los tiempos de sacrificio de este trabajo en particular.

Por otro lado, existe evidencia de la participación del  $Ca^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje en las neuronas corticales que disparan durante el SAG, como una consecuencia de la acción combinada del GABA y una corriente entrante de  $Ca^{2+}$  previa a la infusión de GABA. Después de la interrupción del GABA se presentan grandes corrientes entrantes de  $Ca^{2+}$  en el sitio de infusión lo que suprimiría la sensibilidad a los agonistas al receptor GABAA tanto in vivo como in vitro, debido probablemente a una "down-regulation" de estos receptores, un cambio en su estado de fosforilación o conformación (Silva-Barrat y col., 1992). Este hecho explicaría en este trabajo porque después de la interrupción de la infusión del GABA se presenta un

aumento en la expresión de la proteína c-fos, ya que uno de los mecanismos de inducción de los IEGs es mediado por un aumento en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular a través de los canales de calcio sensibles a voltaje y, además explicaría porque se observa primeramente en el sitio de infusión, que es la corteza motora y no en otras regiones del SNC.

Por otra parte, se ha reportado que la corteza piriforme posterior y el área peririnal, funcionan como un puente crítico en la propagación de las crisis límbicas evocadas desde el "área tempestas"; todas estas estructuras forman parte de la corteza piriforme, misma que esta interconectada con estructuras límbicas como la corteza entorinal, hipocampo, amígdala y el septum (Halonen y col., 1994). Además, se ha observado la inducción de los IEGs, como c-fos, en estas estructuras después de las crisis epilépticas inducidas por la estimulación del área tempestas (Lanaud y col., 1993). En base a esto podemos considerar que la corteza piriforme es una estructura sumamente susceptible a las crisis y que forma parte de un circuito que permite la propagación de las mismas a otras estructuras. En nuestro modelo en particular la expresión de c-fos se presenta solo en la corteza piriforme y en ninguna otra región del sistema límbico, así como sólo una vez iniciada la actividad epiléptica y no antes, lo que sugiere la posible participación de esta estructura pero solo a nivel de su circuito local, generándose en ese sitio los cambios moleculares que precipitarían el fenómeno paroxístico. Además, podemos considerar que la corteza piriforme se conecta a la corteza motora a través del núcleo talámico dorsomedial o a través de las fibras de asociación intrahemisféricas que van del lóbulo temporal (corteza piriforme) a la corteza del lóbulo frontal (corteza motora), como el fascículo arqueado y el uncinado (Barr, M., 1979) y que por lo tanto, es posible que se refuerse el fenómeno paroxístico en las cortezas motora y piriforme a través de estas vías, por lo menos en lo que cabe a la activación genómica, responsable de generar la inducción o el bloqueo de la expresión de genes secundarios que participen en la creación de un medio adecuado para generar el síndrome.

## EXPRESION DE LAS GADs EN EL SAG:

Los resultados del presente trabajo muestran que la expresión de la GAD<sub>67</sub> disminuye en la corteza motora de ratas que presentaron un SAG y se sacrificaron 60 minutos después de la actividad epiléptica, con respecto a su control. El número de células IR- GAD<sub>67</sub> disminuyó significativamente. En el grupo sacrificado al inicio de la actividad epiléptica no se encontraron diferencias significativas con respecto a su control en la corteza motora o alguna otra región del cerebro. Salazar, P. y col. (Salazar y col., 1994) encontraron una disminución en la actividad de la GAD de hasta en un 41% en la corteza motora de ratas sacrificadas post-infusión de GABA (tiempo 0) y 60 minutos después de iniciado el SAG, aunque los niveles de GABA regresaron a su control 60 minutos después de la infusión, la actividad de la GAD permaneció disminuida. Los autores sugieren que este efecto se debe a una disminución en la síntesis de la proteína GAD por el exceso temporal de GABA. Al respecto, trabajos de Rimvall y Martin (Rimvall y Martin, 1994) han demostrado que la proteína GAD<sub>67</sub> es altamente sensible a los cambios en la concentración de GABA intraneuronal, ya que basta el 1% de aumento en la terminal, para que disminuya el nivel de la GAD<sub>67</sub> sinaptosomal en un 12% y en un 3% en la neurona completa. Además, existen cambios paralelos en la actividad y la expresión del mRNA de la GAD y probablemente a la proteína (Segovia y col., 1990). Los resultados de este estudio mostrarían que la disminución en la actividad de la GAD en el SAG se debe a una reducción en la expresión o síntesis de la proteína GAD<sub>67</sub>, ya que el número de células IR- GAD<sub>67</sub> disminuye significativamente en la región de la corteza motora de las ratas sacrificadas a los 60 minutos después del inicio del SAG. El que no se haya presentado una disminución en la expresión de la GAD<sub>67</sub> en el grupo sacrificado después del inicio de la actividad epiléptica, cuando la actividad de la enzima está disminuida (Salazar y col., 1994) muestra que los cambios en la velocidad de síntesis de la proteína probablemente sean muy lentos después de la abstinencia al GABA.

La expresión de la GAD<sub>65</sub> no se vió modificada en los grupos controles y

experimentales de las ratas sacrificadas de acuerdo a la latencia del SAG o inicio de la actividad epiléptica ( $31.50 \pm 4.18$  y  $22.66 \pm 2.84$  células inmunoreactivas, respectivamente). Asimismo, en los grupos controles y experimentales de las ratas sacrificadas de acuerdo a la latencia del SAG + 60 minutos o 60 minutos post-SAG ( $20.16 \pm 3.52$  y  $26.45 \pm 2.17$  células inmunoreactivas, respectivamente) en la región de la corteza motora y, el mismo caso para la región de la amígdala. En el resto de las regiones del cerebro tampoco se pudo apreciar cambio en la expresión de esta proteína a nivel cualitativo. Por lo anterior, podemos afirmar que la disminución en la expresión de la GAD es específica para la GAD<sub>67</sub> en las fases iniciales del SAG. Al respecto, los diversos estudios que han examinado los niveles del mRNA para la GAD<sub>65</sub> han encontrado ligeras alteraciones o ningún cambio (Soghomonian y Chesselet, 1992), como en este trabajo en particular. Por otra parte, existe evidencia de que un porcentaje alto de la GAD<sub>67</sub> se asocia con el PLP y que es la holoenzima o forma activa que es capaz de sintetizar al GABA inmediatamente. En cambio gran parte de la GAD<sub>65</sub> se presenta como apoenzima y requiere asociarse con el PLP antes de sintetizar al GABA (Martin y col., 1991a). Una hipótesis es que la GAD<sub>67</sub> pudiera ser la responsable de los niveles basales de la síntesis de GABA para sus funciones metabólicas o sinápticas (Erlander y Tobin, 1991) y que pudiera estar activa continuamente en la síntesis del GABA, además de ser particularmente importante en las neuronas que presenten patrones de disparo tónico o niveles altos de actividad.

Estas ideas se basan, en parte, en los hallazgos de que la GAD<sub>67</sub> y su mRNA son abundantes en los somas de muchas neuronas GABAérgicas, que es la forma activa de la enzima (Kaufman y col., 1991; Martin y Rimvall, 1993) y los estudios realizados con la técnica de hibridación in situ y fisiológicos, que demuestran la posible relación entre los niveles del mRNA para la GAD y los patrones de disparo neuronal; como en el caso de las neuronas del globo pálido que presentan una frecuencia alta de disparo y exhiben altos niveles de mRNA-GAD<sub>67</sub> o la de las neuronas del estriado con frecuencias bajas de disparo y niveles bajos de mRNA-GAD<sub>67</sub> (Chesselet y col., 1987; Esclapez y col., 1993; Robbins y col., 1992), no se descarta la probabilidad de que otros factores además del patrón

de disparo pudieran influir en los niveles intraneuronales del mRNA- GAD<sub>67</sub>, ya que puede no haber una simple relación entre los niveles del mRNA- GAD<sub>67</sub> y los niveles basales de la actividad neuronal (Houser y Esclapez, 1994).

Por lo anterior, pudieramos considerar que la forma que participa en mayor medida en nuestro modelo en particular, como en el de algunos otros, es la GAD<sub>67</sub> como la forma activa que sintetiza inmediatamente al GABA en la terminal nerviosa y que es la primera en presentar estos cambios. Además, se considera la idea de que la GAD<sub>65</sub> pudiera constituir una reserva de la GAD que puede ser funcionalmente activa en respuesta a factores locales y particularmente importante en la síntesis de GABA en los sitios sinápticos (Erlander y Tobin, 1991; Esclapez y col., 1994; Martin y Rinvall, 1993) en respuesta a las demandas locales y para un mayor control GABAérgico; la GAD<sub>65</sub> dentro de las terminales en las regiones dendríticas pudiera ser convertida de la forma inactiva o apo- a la holoenzima y de esa manera verse aumentada la síntesis de GABA en regiones selectas (Houser y Esclapez, 1994). Por otra parte, existen evidencias que muestran un aumento en la expresión del mRNA- GAD<sub>67</sub> en varios modelos de crisis epilépticas del lobulo temporal o el síndrome epiléptico crónico por la aplicación de toxina tetánica a nivel hipocampal (Feldblum y col., 1990; Najlerahim y col., 1992).

Otros estudios también demuestran un aumento en la expresión de la GAD<sub>67</sub> después de lesiones de hipoxia-isquemia o que aumenten el disparo en las células de Purkinje (Romijn y col., 1993). Sin embargo, existen otros estudios en los que se observa un aumento del mRNA- GAD<sub>67</sub> en estriado y una disminución en la corteza frontal después de lesiones corticales isquémicas (Salin y Chesselet, 1993) o donde no se observan cambios en el mRNA de la GAD después de las crisis inducidas por kindling (Sonnenberg y col., 1991). Sin embargo, el presente trabajo concuerda con los de Obenaus, A. y col. (Obenaus y col., 1993) en los que se observa una disminución en el número de células con mRNA- GAD<sub>67</sub> en el hilus del giro dentado en ratas a las que se indujo crisis con pilocarpina con respecto a sus controles. La disminución que se encontró solo en las células del hilus del giro dentado o de la corteza en este estudio en particular,



muestran la vulnerabilidad diferencial de la gran heterogeneidad de las neuronas GABAérgicas.

No se descarta la posibilidad de que en este modelo se este afectando mayoritariamente los eventos post-sinápticos más que los presinápticos, es decir, que se pueda presentar una desensibilización de los receptores al GABA, debido a la exposición continua a altas concentraciones de GABA. Al respecto, existen evidencias experimentales que demuestran que el tratamiento crónico de etanol (agente que facilita la transmisión GABAérgica), resulta en una alteración en la regulación de la expresión de los mRNAs de las subunidades que conforman el receptor GABAA (Mhatre y Ticku, 1992). Asimismo, la exposición crónica de GABA en neuronas corticales cultivadas disminuye la expresión de los mRNAs y las proteínas a las subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) del receptor GABAA, que probablemente este relacionada con la disminución observada en el número de sitios de unión y el influjo de  $Cl^-$  inducido por el GABA en estas neuronas corticales (Mhatre y Ticku, 1994).

Por otra parte, existe el antecedente de que en rebanadas de la corteza obtenidas de ratas que presentaron un SAG, se presentó una subsensibilidad de las neuronas con ráfagas intrínsecas a la presencia del agonista al receptor GABAA, isoguvacina; se observó una inhibición en las descargas espontáneas de estas neuronas, que es un índice de la inhibición del receptor al GABA (Silva-Barrat y col., 1989). También se ha obtenido el modelo del SAG en ratas con infusiones de isoguvacina, con los mismos patrones de disparo que los que se presentan con el GABA (Brailowsky, S. y Montiel, T., Society of Neuroscience abstracts, 1991). Por lo anterior, la disminución en la expresión de la proteína GAD<sub>67</sub> en el modelo del SAG, así como la disminución en la actividad de la GAD, que es previa a la aparición de las descargas convulsivas, demuestran que estos eventos presinápticos no son críticos en el inicio del SAG y que probablemente sean relevantes para el mantenimiento del mismo.

## EXPRESION DE GFAP EN EL SAG:

La proteína GFAP ha sido uno de los antígenos más ampliamente estudiados en la neurología experimental; los anticuerpos contra esta proteína sirven para identificar astrocitos reactivos en varias condiciones experimentales (Eng, L.F y col., 1987). La GFAP juega un papel importante como la proteína principal que compone los filamentos intermedios en el citoesqueleto de los astrocitos. El daño de la célula glial está ligado a un deterioro en el citoesqueleto de los mismos y alteración de la molécula de GFAP. Durante las situaciones de daño glial se presenta el desamblaje de las subunidades GFAP que conforman los filamentos (Inagaki, M. y col., 1994). El anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo de la proteína GFAP localizado en la región carboxi-terminal, es alterado en las etapas tempranas de la proteólisis de la molécula, por lo que la pérdida de marcaje con este anticuerpo nos indica que es un marcador bastante sensible.

Por otro lado, las moléculas de GFAP que están normalmente ensambladas en los filamentos intermedios, restringen el acceso a los anticuerpos, pero una vez que los filamentos se desamblan en la célula hinchada se presentan más sitios de unión disponibles para los anticuerpos. El aumento de marcaje en los astrocitos hinchados o dañados alrededor de la lesión se explica bien como un aumento de exposición de los epitopes. Típicamente, los astrocitos reactivos aumentan el tamaño del citoplasma y el número y longitud de los procesos en el marcaje a GFAP comparados con los controles respectivos en las mismas áreas del cerebro. Además, se considera que el aumento en la marca para GFAP puede tomarse como una evidencia de la reacción astrocítica a cierta patología neuronal como en el caso del daño neuronal producido por crisis epilépticas y la isquemia (Schmidt-Kastner y col., 1993; Steward, 1994; Torre y col., 1993).

En el modelo de status epilepticus inducido por la administración de pilocarpina se ha encontrado un aumento en la inmunoreactividad para GFAP en y alrededor de la lesión en desarrollo durante las primeras horas y una reactividad difusa persistente en la lesión durante el primer día. Este aumento en la IR a GFAP temprana debido al daño glial pudiera ser diferenciado del aumento

de GFAP a los 2 o 3 días en los astrocitos reactivos localizados alrededor de las áreas dañadas (Schmidt-Kastner y col., 1991). En el modelo de crisis por electroshock también se ha demostrado una "up-regulation" en la expresión del mRNA para GFAP en el giro dentado del hipocampo (Steward, 1994). En otros trabajos se ha observado un aumento en la IR a GFAP tempranamente después de la inyección de la neurotoxina ácido iboténico en el hipocampo (Fuxe y col., 1991) y en la misma región durante anoxia neonatal (Dell'Anna y col., 1995).

En el presente trabajo se observó un aumento de la IR a GFAP alrededor de la zona de lesión, donde se colocaron las canulas de infusión (corteza motora) tanto en los grupos controles como en los experimentales y, con un ligero aumento en la zona de infusión del GABA con respecto al control con infusión de solución salina. También se observó un ligero aumento en la marca a GFAP a nivel del hipocampo, pero en ninguna otra región del cerebro. Estos resultados concuerdan con los trabajos antes referidos, en los que el aumento en la IR a GFAP demuestra la presencia de astrocitos reactivos tempranos alrededor de las zonas de lesión. Asimismo, se ha encontrado en el trabajo de Araneda, S, y col. (Araneda y col., 1994) en el que se ha utilizado el SAC como modelo de epilepsia, como en el presente trabajo, numerosos astrocitos reactivos a GFAP en la zona de infusión del GABA con un número menor en la corteza contralateral. Sus observaciones muestran que la proliferación de astrocitos depende del tipo de daño e involucra al GABA, ya que la lesión cortical focal conjuntamente con la infusión de largo término del GABA (en ese trabajo por 5 días) pudiera provocar gliosis después del daño cerebral. Los autores mencionan que durante el SAC, las relaciones anormales entre los astrocitos dañados y las neuronas pudiera representar uno de los substratos anatómicos responsables del inicio y el mantenimiento de la epilepsia aún por días (Araneda y col., 1994).

Por otro lado, también se ha considerado que la reacción glial pudiera ser inducida por la muerte celular neuronal o la apertura de la barrera hematoencefálica que ocurre como resultado de la actividad de crisis (Nitsch y col., 1986). Se ha reportado también que la actividad neuronal anormal aumenta la expresión tanto del mRNA como de la proteína a GFAP en el giro dentado del

hipocampo (Torre y col., 1993). Este aumento en la producción de GFAP por los astrocitos parece ser un evento temprano que precede a cualquier degeneración neuronal (Hansen y col., 1991; Kelley y Steward, 1993). Por otra parte, se ha mencionado que los astrocitos liberan factores tróficos (laminina, fibronectina), promueven el crecimiento general de los procesos neuronales y expresan moléculas de adhesión celular (Ard y Bunge, 1988; LeGal La Salle y col., 1992; Silver y col., 1982). Al respecto, recientemente se ha demostrado que los astrocitos reactivos que se presentan en las regiones de CA3-CA4 del hipocampo de ratas epilépticas presentan tenascina (sustrato repulsivo para las neuronas) que conjuntamente con otros sustratos o moléculas de adhesión pueden contribuir a guiar el crecimiento axonal. Los autores sugieren que estos astrocitos reactivos pueden contribuir a la navegación del crecimiento de las fibras musgosas, ya que también se ha observado contactos frecuentes de conos de crecimiento (IR a GAP-43) con los astrocitos reactivos en la capa molecular y este contacto es particularmente enriquecido con moléculas NCAM (moléculas de adhesión celular neural) (Niquet y col., 1993).

Podemos considerar en base a lo anterior, que para determinar el posible mecanismo de iniciación del SAG se requiere el estudio de los aspectos postsinápticos, es decir, en relación con los receptores a GABAA, si existe un cambio en la regulación de la expresión de las diferentes subunidades que conforman al receptor o si se presenta una desensibilización de los mismos para que se genere o de inicio la actividad paroxística, que en este modelo se conforma en tres patrones bien caracterizados. En este trabajo se demostró la disminución en la expresión de la GAD67 como un fenómeno que probablemente este relacionado más con el mantenimiento que con la iniciación del SAG. Además, la disminución de la expresión de esta proteína nos hace pensar que el primer deterioro que se presenta una vez iniciado el SAG, es probablemente una disminución en la síntesis de GABA por esta enzima, cuya función principal es la síntesis del mismo bajo condiciones fisiológicas normales, ya que la GAD65 esta más relacionada con una poza de reserva que se puede utilizar cuando bajo ciertas condiciones se requiera mayor síntesis de GABA. Probablemente esta

última proteína se vea afectada después de que queda bien establecido el SAG, es decir, después de un tiempo determinado, ya que en este trabajo las ratas fueron sacrificadas hasta 60 minutos después del SAG, sin encontrar cambios en la expresión de esta proteína.

Por otro lado, la participación del núcleo al inicio de la actividad epiléptica en el SAG (c-fos) pudiera confirmar que se presentan cambios en la regulación de la expresión de genes que estén más relacionados con el inicio del SAG, como pudieran ser las diferentes subunidades al receptor GABAA, por lo que es necesario a futuro emplear técnicas de biología molecular e inmunocitoquímica que nos permitan valorar estos parámetros, así como la realización de "binding" (estudios de unión a receptores) para determinar si existe una desensibilización de receptores. Asimismo, la inmunoreactividad a GFAP, nos pudiera hacer pensar sobre la posible participación de las relaciones glia-neurona en el establecimiento de un sustrato anatómico capaz de generar el fenómeno paroxístico, por lo que sería de gran interés valorar la expresión (inmunocitoquímica) de otro tipo de moléculas que estén relacionadas con este fenómeno, como es el caso de las moléculas de adhesión celular o del citoesqueleto, para evaluar los cambios que se presentan en esta relación a nivel celular.

## CONCLUSIONES

---

1. Los resultados muestran que la expresión de c-fos se presenta al final de la infusión y al inicio de la actividad epiléptica a nivel de la corteza motora y piriforme con respecto a los controles.

2. La expresión de c-fos nos muestra la participación del núcleo 75 a 80 minutos antes del inicio del SAG.

3. No se presenta una clara correlación entre la actividad paroxística y la expresión de c-fos, ya que la IR se presenta solo en el sitio de infusión del GABA y no en la corteza contralateral, cuando se presenta propagación de la actividad epiléptica al otro hemisferio cerebral.

4. En el SAG la expresión de la GAD67 se ve disminuida con respecto al control a nivel de la corteza motora 60 minutos después del SAG y en ninguna otra región del cerebro. La GAD65 permanece sin cambios significativos en los tres grupos experimentales con respecto a sus controles.

5. Se presentan astrocitos reactivos alrededor de las zonas de lesión (corteza motora) donde se colocan las cánulas de infusión tanto en los grupos controles como experimentales. Se presenta un ligero aumento en la IR-GFAP en el sitio de infusión del GABA con respecto a la corteza contralateral. En el hipocampo ipsilateral también se presenta IR-GFAP sin la presencia de la expresión de c-fos.

## REFERENCIAS

---

Alford, S., y Grillner, S. (1991). "The involvement of GABAB receptors and coupled G-proteins in spinal GABAergic presynaptic inhibition." *The Journal of Neuroscience*, **11**, 3718-3726.

Anderson, A. J., Cummings, B. J., y Cotman, C. W. (1994). "Increased immunoreactivity for jun- and fos-related proteins in Alzheimer's disease: association with pathology." *Experimental Neurology*, **125**, 286-295.

Araki, T., Kiyama, H., y Tohyama, M. (1992). "The GABAA receptor  $\gamma 1$  subunit is expressed by distinct neuronal populations." *Molecular Brain Research*, **15**, 121-132.

Araki, T., y Tohyama, M. (1992). "Region-specific expression of GABAA receptor  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  subunits mRNAs in the rat brain." *Molecular Brain Research*, **12**, 293-314.

Araneda, S., Silva-Barrat, C., Menini, C., y Naquet, R. (1994). "High expression of noradrenaline, choline acetyltransferase and glial fibrillary acidic protein in the epileptic focus consecutive to GABA withdrawal. An immunocytochemical study." *Brain Research*, **655**, 135-146.

Ard, M. D., y Bunge, R. P. (1988). "Heparan sulfate proteoglycan and laminin immunoreactivity on cultured astrocytes: relationship to differentiation and neuritic growth." *Journal of Neuroscience*, **8**, 2844-2858.

Arias, C., Valero, H., y Tapia, R. (1992). "Inhibition of brain glutamate decarboxylase activity is related to febrile seizures in rats pups." *Journal of Neurochemistry*, **58**, 369-373.

Barone, P., Morelli, M., Cicarelli, G., Cozzolino, A., DeJoanna, G., Campanella, G., y DiChiara, G. (1993). "Expression of c-fos protein in the experimental epilepsy induced by pilocarpine." *Synapse*, **14**, 1-9.

Barr, M. L. (1979). "Motor systems." *The human nervous system. An anatomical viewpoint.* Harper and Row, U.S.A., 268-278.

Behar, T., Schaffner, A., Laing, P., Hudson, L., Komoly, S., y Barker, J.

(1993). "Many spinal cord cells transiently express low molecular weight forms of glutamic acid decarboxylase during embryonic development." *Developmental Brain Research*, **72**, 203-218.

Bellman, R., Widmann, R., Olenik, C., Meyer, D. K., Maas, D., Marksteiner, J., y Sperk, G. (1991). "Enhanced rate of expression and biosynthesis of neuropeptide Y after kainic acid-induced seizures." *Journal of Neurochemistry*, **56**, 525-530.

Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Riche, D., Ghilini, G., y Naquet, R. (1981). "Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy." *Neuroscience*, **6**, 1361-1391.

Bormann, J. (1988). "Electrophysiology of GABAA y GABAB receptor subtypes." *Trends in Neurosciences*, **11**, 112-116.

Brailowsky, S. (1991). "El síndrome de abstinencia al GABA: un modelo de epileptogénesis focal." *Epilepsia experimental*, S. Brailowsky y E. Otero-siliceo, eds., Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y Academia Mexicana de Neurología, México, D. F., 121-129.

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

Brailowsky, S., Kunimoto, M., Silva-Barrat, C., Menini, C., y Naquet, R. (1990a). "Electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in rats." *Epilepsia*, **31**, 369-377.

Brailowsky, S., y Montiel, T. (1991). "Isoguvacine suppression induces long-lasting epileptogenic changes in the rat." *Society for Neuroscience Abstracts*, **17**, 174.

Brailowsky, S., Silva-Barrat, C., Menini, C., Riche, D., y Naquet, R. (1990b). "Anticonvulsant effects of intracortical chronic infusion, of GABA in generalized epilepsy In: " Generalized Epilepsy, cellular, molecular and pharmacological approaches, M. Avoli, P. Gloor, G. Kostopoulos, y R. Naquet,



eds., Birkhauser, Boston, 126-136.

Brailowsky, S., Silva-Barrat, C., Ménini, C., Riche, D., y Naquet, R. (1989). "Effects of localized, chronic GABA infusions into different cortical areas of the photosensitive baboon, *Papio papio*." *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*, **72**, 147-156.

Brooks-Kayal, A. R., y Pritchett, D. B. (1993). "Developmental changes in human gamma-aminobutyric acid A receptor subunit composition." *Annals of Neurology*, **34**, 687-693.

Bu, D.-F., Erlyer, M. G., Hitz, B. C., Tillakaratne, N. J. K., Kaufman, D. L., Wagner-McPherson, C. B., Evans, G. A., y Tobin, A. J. (1992). "Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67 kDa GAD, are each encoded by a single gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, **89**, 2115-2119.

Bullitt, E. (1990). "Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat." *The journal of Comparative Neurology*, **296**, 517-530.

Burgard, E. C., y Sarvey, J. M. (1991). "Long-Lasting Potentiation and Epileptiform Activity Produced by GABA-B Receptor Activation in the Dentate Gyrus of Rat Hippocampal Slice." *Journal of Neuroscience*, **11**, 1198-1209.

Caron, P. C., Kremzner, L. T., y Cote, L. J. (1987). "GABA and its relationship to putrescine metabolism in the rat brain and pancreas." *Neurochemistry International*, **10**, 219-229.

Clark, M., Massenburg, G. S., Weiss, S. R. B., y Post, R. M. (1994). "Analysis of the hippocampal GABA<sub>A</sub> receptor system in kindled rats by autoradiographic and in situ hybridization techniques: contingent tolerance to carbamazepine." *Molecular Brain Research*, **26**, 309-319.

Clark, M., Post, R. M., Weiss, S. R. B., Cain, C. J., y Nakajima, T. (1991). "Regional expression of c-fos mRNA in rat brain during the evolution of amygdala kindled seizures." *Molecular Brain Research*, **11**, 55-64.

Clifford, D. B., Zorumski, C. F., y Olney, J. W. (1989). "Ketamine and MK-801 prevent degeneration of thalamic neurons induced by focal cortical seizures."

*Experimental Neurology*, **105**, 272-279.

Cole, A. J., Abu-Shakra, S., Saffen, D. W., Baraban, J. M., y Worley, P. F. (1990). "Rapid rise in transcription factor mRNAs in rat brain after electroshock-induced seizures." *Journal of Neurochemistry*, **55**, 1920-1927.

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

Crawford, M. L. A., y Young, J. M. (1988). "GABAB receptor-mediated inhibition of histamine H<sub>1</sub>-receptor induced inositol phosphate formation in slices of rat cerebral cortex." *Journal of Neurochemistry*, **51**, 1441-1447.

Croucher, M. J., y Bradford, H. E. (1989). "Kindling of full limbic seizures by repeated microinjections of excitatory amino acids into the rat amygdala." *Brain Research*, **501**, 58-65.

Croucher, M. J., Collins, J. F. y Meldrum, B. S. (1982). "Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonist." *Science*, **216**, 899-901.

Chang, Y.-C., y Gottlieb, D. I. (1988). "Characterization of protein purified with monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase." *Journal of Neuroscience*, **8**, 2123-2130.

Chesselet, M.-F., Weiss, L., Wuenschell, C., y Tobin, A. J. (1987). "Comparative distribution of mRNAs for glutamic acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase, and tachykinins in the basal ganglia: an in situ hybridization study in the rodent brain." *Journal of Comparative Neurology*, **262**, 125-140.

Daune, G., y Seiler, N. (1988). "Interrelationships between ornithine, glutamate, and GABA. II. Consequences of inhibition of GABA-T and ornithine aminotransferase in brain." *Neurochemistry Research*, **13**, 69-75.

Daval, J. L., Nakajima, T., Gleiter, C. H., Post, R. M., Marangos, P. J. (1989). "Mouse brain c-fos mRNA distribution following a single electroconvulsive shock." *Journal of Neurochemistry*, **52**, 1954-1957.

Dave, J. R., y Tortella, F. C. (1994). "Regional changes in c-fos mRNA in rat brain after i.v. or i.c.v. NMDA injections." *NeuroReport*, **5**, 1645-1648.

Dell'Anna, M. E., Concetta-Geloso, M., Draisci, G., y Luthman, J. (1995). "Transient changes in fos and gfap immunoreactivity precede neuronal loss in

the rat hippocampus following neonatal anoxia." *Experimental Neurology*, **131**, 144-156.

Deutsch, S. I., Mastropalo, J., y Hitri, A. (1992). "GABA-active steroids-endogenous modulators of GABA-gated chloride ion conductance." *Clinical Neuropharmacology*, **15**, 352-364.

Dichter, M. A. (1989). "Cellular mechanisms of epilepsy and potential new treatment strategies." *Epilepsia*, **30**, S0-S12.

Dichter, M. A. (1994). "Emerging insights into mechanisms of epilepsy: implications for new antiepileptic drug development." *Epilepsia*, **35**, S51-S57.

Douglass, J., Grimes, L., Shook, J., Lee, P. H. K., y Hong, J.-S. (1991). "Systemic administration of kainic acid differentially regulates the levels of prodynorphin and proenkephalin mRNA and peptides in the rat hippocampus." *Molecular Brain Research*, **9**, 79-86.

Dragunow, M., y Roberts, H. A. (1987). "Generalized seizures induce c-fos protein(s) in mammalian neurons." *Neuroscience Letters*, **82**, 157-161.

Dragunow, M., Yamada, N., Bilkey, D. K., y Lawlor, P. (1992). "Induction of immediate-early gene proteins in dentate granule cells and somatostatin interneurons after hippocampal seizures." *Molecular Brain Research*, **13**, 119-126.

Dugich-Djordjevic, M. M., Tocco, G., Lapchak, P. A., Pasinetti, G. M., Najm, I., Baudry, M., y Hefti, F. (1992). "Regionally specific and rapid increases in brain-derived neurotrophic factor messenger RNA in the adult rat brain following seizures induced by systemic administration of kainic acid." *Neuroscience*, **47**, 303-315.

During, M. J., y Spencer, D. D. (1993). "Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain." *Lancet*, **341**, 1607-1610.

Eng, L. F., Reier, P. J., y Houle, J. D. (1987). "Astrocyte activation and fibrous gliosis: glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal tissue." *Progress in Brain Research*, **71**, 439-455.

Engelsen, B. (1986). "Neurotransmitter glutamate: its clinical importance." *Acta of Neurology Science*, **74**, 337-355.

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

Erlander, M. G., y Tobin, A. J. (1991). "The structural and functional heterogeneity of glutamic acid Decarboxylase: a review." *Neurochemical Research*, **16**, 215-226.

Erlander, M. G., y Tobin, A. J. (1992). "A transcriptional regulatory element of the gene encoding the 67 000 Mr form of human glutamate decarboxylase is similar to a drosophila regulatory element." *Journal of Neurochemistry*, **58**, 2182-2190.

Esclapez, M., Tillakaratne, N. J. K., Kaufman, D. L., Tobin, A. J., y Houser, C. R. (1994). "Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms." *The Journal of Neuroscience*, **14**, 1834-1855.

Esclapez, M., Tillakaratne, N. J. K., Tobin, A. J., y Houser, C. R. (1993). "Comparative localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase with nonradioactive in situ hybridization methods." *Journal of Comparative Neurology*, **331**, 339-362.

Ewert, M., de Blas, A. L., Mohler, H., y Seeburg, P. H. (1992). "A prominent epitope on GABAA receptors is recognized by two different monoclonal antibodies." *Brain Research*, **569**, 57-62.

Fagg, G. E., y Foster, A. C. (1983). "Amino-acid neurotransmitter and their pathways in the mammalian central nervous system." *Neuroscience*, **9**, 701-719.

Faingold, C. L. (1988). "The genetically epilepsy-prone rat." *Genetics in Pharmacology*, **19**, 331-338.

Faingold, C. L., Naritoku, D. K., Copley, C. A., Ryal, M. E., Riaz, A., Yersen, C. A., y Arneric, S. P. (1992). "Glutamate in the inferior colliculus plays a critical role in audiogenic seizure initiation." *Epilepsy Research*, **13**, 95-105.

Faulkner-Jones, B. E., Cram, D. S., Kun, J., y Harrison, L. C. (1993). "Localization and quantitation of expression of two glutamate decarboxylase genes in pancreatic  $\beta$ -cells and other peripheral tissues of mouse and rat." *Endocrinology*, **133**, 2962-2972.

Feldblum, S., Ackermann, R. F., y Tobin, A. J. (1990). "Long-term increase of glutamate decarboxylase mRNA in a rat model of temporal lobe epilepsy." *Neuron*, 5, 361-371.

Feldblum, S., Erlyer, M. G., y Tobin, A. J. (1993). "Different distributions of GAD 65 and GAD 67 mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles." *Journal of Neuroscience Research*, 34, 689-706.

Fisher, R. S. (1991). "Clinical overview of epilepsy." *Neurotransmitters and Epilepsy*. Frontiers of clinical neuroscience vol. II. Fisher, R. S. y Coyle, J. T. eds., Wiley-Liss, U.S.A., 61-76.

Fonnum, F. (1984). "Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain." *Journal of Neurochemistry*, 42, 1-11.

Friedlander, W. J. (1986). "Who was "the father of bromide treatment of epilepsy?" *Archives of Neurology*, 43, 505-507.

Friedman, L. K., Pellegrini-Giampietro, D. E., Sperber, E. F., Bennett, M. B., Moshe, S. L., y Zukin, R. S. (1994). "Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABAA receptor gene expression in adult rat hippocampus: an in situ hybridization study." *Journal of Neuroscience*, 14, 2697-2707.

Fukuda, H., Brailowsky, S., Menini, C., Silva-Barrat, C., Riche, D., y Naquet, R. (1987). "Anticonvulsant effect of intracortical, chronic infusion of GABA in kindled rats." *Experimental Neurology*, 98, 120-129.

Fukuzako, H., y Izumi, K. (1991). "Clinical aspects of the epilepsies." *GABA mechanisms in Epilepsy*, G. Tunnicliff y B. U. Raess, eds., John Wiley-Liss Inc., New York, U.S.A, 1-30.

Fuxe, K., Kurosawa, M., Cintra, A., Gojny, M., Hallstrom, A., Rosen, L., Ungerstedt, U., y Agnati, L. F. (1991). "Endothelium-1-induced lesions in the brain as a new model of focal ischemia." *Methods in Neuroscience*, 7, 256-282.

Gale, K. (1992). "GABA y Epilepsy: basic concepts from preclinical research." *Epilepsia*, 33, S3-S12.

Gale, K., Zhong, P., Miller, L. P., y Murray, T. F. (1992). "Amino acid neurotransmitter interactions in "area tempestas": an epileptogenic trigger zone in the deep prepiriform cortex." *Epilepsy Research Supplement*, 8, 229-234.

Gall, C., Sumikawa, K., y Lynch, G. (1990). "Levels of mRNA for a putative kainate receptor are affected by seizures." *Proceedings of National Academic of Sciences USA*, **87**, 7643-7647.

Garant, D. S., Xu, S. G., Sperber, E. F., y Moshe, S. L. (1993). "The influence of thalamic GABA transmission on the susceptibility of adult rats to flurothyl induced seizures." *Epilepsy Research*, **15**, 185-192.

Gass, P., Herdegen, T., Bravo, R., y Kiessling, M. (1992). "Induction of immediate early gene encoded proteins in the rat hippocampus after bicuculline-induced seizures: differential expression of krox-24, fos and jun proteins." *Neuroscience*, **48**, 315-324.

Gass, P., Herdegen, T., Bravo, R., y Kiessling, M. (1993a). "Induction and suppression of immediate early genes (IEGs) in specific rat brain regions by the non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801." *Neuroscience*, **53**, 749-758.

Gass, P., Herdegen, T., Bravo, R., y Kiessling, M. (1993b). "Spatiotemporal induction of immediate early genes in the rat brain after limbic seizures: effects of NMDA receptor antagonist MK-801." *European Journal of Neuroscience*, **5**, 933-943.

Geddes, J. W., Cahan, L. D., Cooper, S. M., Kim, R. C., Choi, B. H., y Cotman, C. W. (1990). "Altered distribution of excitatory amino acid receptors in temporal lobe epilepsy." *Experimental Neurology*, **108**, 214-220.

Gloor, P., y Olivier, A. (1982). "The role of the limbic system in experiential phenomena of temporal lobe epilepsy." *Annals of Neurology*, **12**, 129-144.

Godfrey, P. P., Grahame-Smith, D. G., y Gray, J. A. (1988). "GABAB receptor activation inhibits 5-hydroxytryptamine-stimulated inositol phospholipid turnover in mouse cerebral cortex." *European Journal of Pharmacology*, **152**, 185-188.

Gould, E. M., Craig, C. R., Fleming, W. W., y Taylor, D. A. (1991). "Sensitivity of cerebellar purkinje neurons to neurotransmitters in genetically epileptic rats." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **259**, 1008-1012.

Green, R. C., Blume, H. W., Kupfershmid, S. B., y Mesulam, M. M. (1989).

"Alterations of hippocampal acetylcholinesterase in human temporal lobe epilepsy." *Annals of Neurology*, **26**, 347-351.

Greif, K. F., Erlyer, M. G., Tillakaratne, N. J. K., y Tobin, A. J. (1991). "Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum." *Neurochemical Research*, **16**, 235-242.

Halonen, T., Tortorella, A., Zrebeet, H., y Gale, K. (1994). "Posterior piriform and perirhinal cortex relay seizures evoked from the area tempestas: role of excitatory and inhibitory amino acid receptors." *Brain Research*, **652**, 145-148.

Hanley, M. R. (1988). "Proto-oncogenes in the nervous system." *Neuron*, **1**, 175-182.

Hansen, A., Jorgensen, O. S., Bolwing, T. G., y Barry, D. I. (1991). "Hippocampal kindling in the rat in associated with time-dependent increases in the concentration of glial fibrillary acidic protein." *Journal of Neurochemistry*, **57**, 1716-1720.

Herdegen, T., Sykuhler, J., Gass, P., Kiessling, M., Bravo, R., y Zimmermann, M. (1993). "Jun, fos, krox, and CREB transcription factor proteins in the rat cortex: basal expression and induction by spreading depression and epileptic seizures." *The Journal of Comparative Neurology*, **333**, 271-288.

Heuschneider, G., y Schwartz, R. D. (1989). "cAMP and forskolin decrease gamma-aminobutyric acid-gated chloride flux in rat brain synaptoneuroosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, **86**, 2938-2942.

Hochstenbach, S. L., Solano-Flores, L. P., y Ciriello, J. (1993). "Fos induction in brainstem neurons by intravenous hypertonic saline in the conscious rat." *Neuroscience Letters*, **158**, 225-228.

Holz, G. G., Rane, S. G., y Dunlap, K. (1986). "GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels." *Nature*, **319**, 670-672.

Honkanieni, J., Kainu, T., Ceccaelli, S., Rechartd, L., Hokfelt, T., y Pelto-Huikko, M. (1992). "Fos and jun in rat central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus after stress." *NeuroReport*, **3**, 849-852.

Horton, R. W., y Meldrum, B. S. (1973). "Seizures induced by alyglycine, 3-mercaptopropionic acid and 4-deoxypyridoxine in mice and photosensitive baboons, and different modes of inhibition of cerebral glutamis acid decarboxylase." *British Journal of Pharmacology*, **49**, 52-63.

Houser, C. R., y Esclapez, M. (1994). "Localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase in the rat hippocampal formation." *Hippocampus*, **4**, 530-545.

Ikeda, J., Nakajima, T., Osborne, O. C., Mies, G., y Nowak Jr, T. S. (1994). "Coexpression of c-fos and hsp 70 mRNAs in gerbil brain after ischemia:induction threshold, distribution and time course evaluated by in situ hybridization." *Molecular Brain Research*, **26**, 249-258.

Inagaki, M., Nakamura, Y., Takeda, M., Nishimura, T. y Inagaki, N. (1994). "Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation." *Brain Phathology*, **4**, 239-243.

Ito, M. (1994). "Neurochemical Approach to Epilepsy." *No To Hattatsu*, **26**, 101-110.

Ivkovic, S., Kanazir, S., Stojiljkovic, M., Rakic, L., y Ruzdijic, S. (1994). "Desensitization of c-fos mRNA expression in rat brain following cortical lesions." *Molecular and Cellular Neurosciences*, **5**, 11-22.

Jacobs, O., Bree, L. V., Mailleux, P., Zhang, F., Schiffmann, S. N., Halleux, P., Albala, N., y Vyerhaeghen, J.-J. (1994). "Homolateral cerebrocortical increase of immediate early gene and neurotransmitter messenger RNAs after minimal cortical lesion: blockade by n-methyl-d-aspartate antagonist." *Neuroscience*, **59**, 827-836.

Janjua, N. A., Yerman, E., Eeg-Olofsson, O., y Lemieux, B. (1989). "Plasma amino acid and genetic studies in epilepsy." *Genetics of the epilepsies*, G. Beck-Mannagetta, V. E. Yerson, H. Doose, y D. Janz, eds., Springer-Verlag, Berlin, 162-171.

Janjua, N. A., Mori, A., y Hiramatsu, M. (1991). "Gamma-aminobutyric acid uptake is decreased in the hippocampus in a genetic model of human temporal lobe epilepsy." *Epilepsy Research*, **8**, 71-74.



Jensen, F. E., Firkusny, I. R., y Mower, G. D. (1993). "Differences in c-fos immunoreactivity due to age and mode of seizure induction." *Molecular Brain Research*, **17**, 185-193.

Johansen, F. F., Christensen, T., Jensen, M. S., Valente, E., Jensen, C. V., Nathan, T., Lambert, J. D. C., y Diemer, N. H. (1991). "Inhibition in Postschismic Rat Hippocampus - GABA Receptors, GABA Release, and Inhibitory Postsynaptic Potentials." *Experimental Brain Research*, **84**, 529-537.

Johnson, D. D., y Tuckek, J. M. (1987). "The epileptic chickens." Neurotransmitters and epilepsy, P. C. Jobe y H. E. Laird, eds., Humana Press, New Jersey, U.S.A., 95-114.

Kaczmarek, L. (1993). "Molecular biology of vertebrate learning: is c-fos a new beginning?" *Journal of Neuroscience Research*, **34**, 377-381.

Kalviainen, T. H., Pitkanen, A., y Riekkinen. (1993). "Amino acid levels in the cerebrospinal fluid of newly diagnosed epileptic patients: effect of vogabatin y carbamazepine monotherapies." *Journal of Neurochemistry*, **60**, 1244-1250.

Kaminska, B., Filipkowski, R. K., Zurkowska, G., Lason, W., Przewlocki, R., y Kaczmarek, L. (1994). "Dynamic changes in the composition of the AP-1 transcription factor DNA-binding activity in rat brain following kainate-induced seizures and cell death." *European Journal of Neuroscience*, **6**, 1558-1566.

Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A., y Schwartz, J. H. (1991). "Synaptic transmission." Principles of Neural Science. Kandel, E. R., Schwartz, J. H., y Jessell, t. M., eds., Elsevier, U.S.A., 123-134.

Kaufman, D. L., Houser, C. R., y 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**, 720-723.

Kaufman, D. L., McGinnis, J. F., Krieger, N. R., y Tobin, A. J. (1986). "Brain Glutamate decarboxylase cloned in  $\lambda$ gt-11: fusion protein produces  $\gamma$ -aminobutyric acid." *Science*, **232**, 1138-1140.

Keir, W. J., y Morrow, A. L. (1994). "Differential expression of GABAA receptor subunit mRNAs in ethanol-naive withdrawal seizure resistant (WSR)

vs. withdrawal seizure prone (WSP) mouse brain." *Molecular Brain Research*, **25**, 200-208.

Kelley, M. S., y Steward, O. (1993). "The role of neuronal activity in upregulating GFAP mRNA levels after electrolytic lesions of the entorhinal cortex." *International Journal of Developing Neuroscience*, **11**, 105-115.

Kiessling, M., y Gass, P. (1993). "Immediate early gene expression in experimental epilepsy." *Brain Pathology*, **3**, 381-393.

Killam, K. F., Killam, E. K., y Naquet, R. (1967). "An animal model of light sensitive epilepsy." *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **22**, 497-513.

Kincaid, A. E., Albin, R. L., Newman, S. W., Penney, J. B., y Young, A. B. (1992). "6-Hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway alter the expression of glutamate decarboxylase messenger RNA in rat globus pallidus projection neurons." *Neuroscience*, **51**, 705-718.

Kirkness, E. F., y Turner, A. J. (1988). "Antibodies directed against a nonpeptide sequence of the  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA)-benzodiazepine receptor  $\alpha$  subunit." *Journal of Biochemistry*, **256**, 291-294.

Kobayashi, Y., Kaufman, D. L., y Tobin, A. J. (1987). "Glutamic acid decarboxylase cDNA: nucleotide sequence encoding an enzymatically active fusion protein." *Journal of Neuroscience*, **7**, 2768-2772.

Kohmura, E., Yuguchi, T., Yamada, K., Sakaguchi, T., Wanaka, A., y Hayakawa, T. (1995). "Expression of c-fos mRNA after cortical ablation in rat brain is modulated by basic fibroblast growth factor (bFGF) and the NMDA receptor is involved in c-fos expression." *Molecular Brain Research*, **28**, 117-121.

Kolasa, K., Kleinrok, Z., Consolo, S., Ferrario, P., y Zecca, L. (1992). "Susceptibility to seizures produced by chemical convulsants and maximal electric shock in rats after electrolytic lesions into the red nucleus." *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **41**, 99-103.

Krauss, G. L., Kaplan, P., y Fisher, R. S. (1989). "Parenteral magnesium sulfate fails to control electroshock and pentylenetetrazole seizures in mice." *Epilepsy Research*, **4**, 201-206.

Kuriyama, K., Hirouchi, M., y Nakayasu, H. (1993). "Structure and function of cerebral GABAA and GABAB receptors." *Neuroscience Research*, **17**, 91-99.

Lanaud, P., Maggio, R., Gale, K., y Grayson, D. R. (1993). "Temporal and spatial patterns of expression of c-fos, zif/268, c-jun and jun-B mRNAs in rat brain following seizures evoked focally from the deep prepiriform cortex." *Experimental Neurology*, **119**, 20-31.

Laurie, D. J., Seeburg, P. H., y Wisden, W. (1992). "The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum." *The Journal of Neuroscience*, **12**, 1063-1076.

Le Gal La Salle, G. S., Brailowsky, S., Menini, C., y Naquet, R. (1988). "Local asymptomatic status epilepticus induced by withdrawal of GABA infusion into limbic structures." *Experimental Neurology*, **101**, 411-417.

Le Gal La Salle, G., Rougon, G., y Valin, A. (1992). "The embryonic form of neural cell surface molecule (E-NCAM) in the rat hippocampus and its reexpression on glial cells following kainic acid-induced status epilepticus." *Journal of Neuroscience*, **12**, 872-882.

Liu, P. K., Salminen, A., He, Y. Y., Jiang, M. H., Xue, J. J., Liu, J. S., y Hsu, C. Y. (1994). "Suppression of ischemia-induced fos expression and AP-1 activity by an antisense oligodeoxynucleotide to c-fos mRNA." *Annals of Neurology*, **36**, 566-576.

Liu, Z., Vergnes, M., Depaulis, A., y Marescaux, C. (1992). "Involvement of intrathalamic GABAB neurotransmission in the control of absence seizures in the rat." *Neuroscience*, **48**, 87-93.

Locock, C. (1857). "Discussion of paper by E.H. Sieveking: Analysis of 52 cases of epilepsy observed by author." *Lancet*, **1**, 527.

Lothman, E. W., Collins, R. C., y Ferrendelli, J. A. (1981). "Kainic acid-induced limbic seizures: electrophysiologic studies." *Neurology*, **31**, 806-812.

Lloyd, K. G., Scatton, B., Voltz, C., Valin, A., Bryere, P., y Naquet, R. (1986). "Amino acid and monoamine metabolite levels in the CSF of *Papio papio*. Correlation with degree of photosensitive." *Brain Research*, **363**, 390-394.

Ma, W., Behar, T., Chang, L., y Barker, J. L. (1994). "Transient increase in expression of GAD 65 and GAD 67 mRNAs during postnatal development of rat spinal cord." *The Journal of Comparative Neurology*, **346**, 151-160.

Marescaux, C., Vergnes, M., y Depaulis, A. (1992). "Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg- a review." *Journal of Neural Transmission*, Suppl. **35**, 37-69.

Martin, D. L. (1993). "Short-term control of GABA synthesis in brain." *Prog. Biophys. molec. Biol.*, **60**, 17-28.

Martin, D. L., Martin, S. B., Wu, S. J., y Espina, N. (1991a). "Cofactor interactions and the regulation of glutamate decarboxylase activity." *Neurochemical Research*, **16**, 243-249.

Martin, D. L., Martin, S. B., WU, S. J., y Espina, N. (1991b). "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." *The Journal of Neuroscience*, **11**, 2725-2731.

Martin, D. L., y Rimvall, K. (1993). "Regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis in the brain." *Journal of Neurochemistry*, **60**, 395-407.

Masood, K., Besnard, F., Su, Y., y Brenner, M. (1993). "Analysis of a segment of the human glial fibrillary acidic protein gene that directs astrocyte-specific transcription." *Journal of Neurochemistry*, **61**, 160-166.

Massieu, L., Rivera, A., y Tapia, R. (1994). "Convulsions and inhibition of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate- $\gamma$ -glutamyl hydrazone in the developing rat." *Neurochemical Research*, **19**, 183-187.

Mattson, R. H., Petroff, O., Rothman, D., y Behar, K. (1994). "Vigabatrin: effects on human brain GABA levels by nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Epilepsia*, **35**, S29-S32.

Mayer, M. L., Westbrook, G. L., y Guthrie, B. (1984). "Voltage-dependent block by Mg of NMDA responses in spinal cord neurons." *Nature*, **309**, 261-263.

McDonald, J. W., Garofalo, E. A., Hood, T., Sackellares, J. C., Gilman, S., McKeever, P. E., Troncoso, J. C., y Johnston, M. W. (1991). "Altered excitatory and inhibitory amino acid binding in hippocampus of patients with temporal lobe

epilepsy." *Annals of Neurology*, **29**, 529-541.

Medina-Kauwe, L. K., Tillakaratne, N. J., Wu, J. Y., y Tobin, A. J. (1994). "A rat brain cDNA encodes enzymatically active GABA transaminase and provides a molecular probe for GABA-catabolizing cells." *Journal of Neurochemistry*, **62**, 1267-1275.

Meldrum, B. S., y Champman, A. G. (1986). "Benzodiazepine receptors and their relationship to epilepsy." *Epilepsia*, **27** (Suppl 1), S3-S13.

Menini, C., Mraovitch, S., Calyo, Y., Delasayette, V., Silvabarrat, C., Brailowsky, S., y Seylaz, J. (1991). "Metabolic Anatomy of the Focal Epilepsy Produced by Cessation of Chronic Intracortical GABA Infusion in the Rat." *Neuroscience*, **41**, 607-615.

Mercugliano, M., Soghomonian, J.-J., Qin, Y., Nguyen, H. Q., Feldblum, S., Erlyer, M. G., Tobin, A. J., y Chesselet, M.-F. (1992). "Comparative distribution of messenger RNAs encoding glutamic acid decarboxylases (Mr 65 000 and Mr 67 000) in the basal ganglia of the rat." *The Journal of Comparative Neurology*, **318**, 245-254.

Mhatre, M. C., y Ticku, M. K. (1992). "Chronic ethanol administration alters  $\gamma$ -aminobutyric acidA receptor gene expression." *Molecular Pharmacology*, **42**, 415-422.

Mhatre, M. C., y Ticku, M. K. (1994). "Chronic GABA treatment down regulates the GABAA receptor  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$  subunit mRNAs as well as polypeptide expression in primary cultured cerebral cortical neurons." *Molecular Brain Research*, **24**, 159-165.

Mileson, B. E., Ehrmann, M. L., y Schwartz, R. D. (1992). "Alterations in the  $\gamma$ -aminobutyric acid-gated chloride channel following transient forebrain ischemia in the gerbil." *Journal of Neurochemistry*, **58**, 600-607.

Miller, J. W., y Ferrendelli, J. A. (1990). "Characterization of GABAergic seizure regulation in the midline thalamus." *Neuropharmacology*, **29**, 649-655.

Miyata, S., Nakashima, T., y Kiyohara, T. (1994). "Expression of c-fos immunoreactivity in the hypothalamic magnocellular neurons during chronic osmotic stimulations." *Neuroscience Letters*, **175**, 63-66.

Moffett, J. R., Palkovits, M., Namboodiri, M. A. A., y Neale, J. H. (1994). "Comparative distribution of N-acetylaspartylglutamate and GAD 67 in the cerebellum and precerebellar nuclei of the rat utilizing enhanced carbodimide fixation and immunohistochemistry." *The Journal of Comparative Neurology*, **347**, 598-618.

Morgan, J. I. (1991a). "Proto-oncogenes and signal transduction". Proto-oncogene expression in the nervous system, Magistretti, P.J. ed. Elsevier, Amsterdam, 16-20.

Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., y Curran, T. (1987). "Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure." *Science*, **237**, 192-197.

Morgan, J. I., y Curran, T. (1991b). "Proto-oncogene transcription factors and epilepsy." *Trends in Pharmacological Sciences*, **12**, 343-349.

Morimoto, K., Sanei, T., y Sato, K. (1993). "Comparative study of the anticonvulsant effect of gamma-aminobutyric acid agonists in the feline kindling model of epilepsy." *Epilepsia*, **34**, 1123-1129.

Murashima, Y. L., Kasamo, K., y Suzuki, J. (1994). "Regional differences of immediate early gene expressions in the brain of E1 mice as examined with development and seizure history." *The Japanese Journal of psychiatry and Neurology*, **48**, 275-279.

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

Najlerahim, A., Williams, S. F., Pearson, R. C. A., y Jefferys, J. G. R. (1992). "Increased expression of GAD mRNA during the chronic epileptic syndrome due to intrahippocampal tetanus toxin." *Experimental Brain Research*, **90**, 332-342.

Nakayasu, H., Mizutani, H., Hanai, K., Kimura, H., y Kuriyama, K. (1992). "Monoclonal antibody to GABA binding protein, a possible GABAB receptor." *Boichemical and Biophysical Research communications*, **182**, 722-726.

Nathan, B., Bao, J., Hsu, C.-C., Yarom, M., Deupree, D. L., Lee, Y.-H., Tang, X.-W., Kuo, C.-Y., Burghen, G. A., y Wu, J.-Y. (1994). "An integral membrane

protein form of brain L-glutamate decarboxylase: purification, characterization and its relationship to insulin-dependent diabetes mellitus." *Brain Research*, **642**, 297-302.

Niquet, J., Jorquera, I., y Ben-Ari, Y. (1993). "NCAM immunoreactivity on mossy fibers and reactive astrocytes in the hippocampus of epileptic rats." *Brain Research*, **626**, 106-116.

Nisenbaum, E. S., Berger, T. W., y Grace, A. A. (1992). "Presynaptic modulation by GABAB receptors of glutamatergic excitation and GABAergic inhibition of neostriatal neurons." *Journal of Neurophysiology*, **67**, 477-481.

Nitsch, C., Goping, G., y Klatzo, I. (1986). "Pathophysiological aspects of blood-brain barrier permeability in epileptic seizures." Excitatory amino acids and epilepsy, R. Schwarcz y Y. Ben-Ari, eds., Plenum Press, New York, 175-189.

Obenaus, A., Esclapez, M., y Houser, C. R. (1993). "Loss of glutamate decarboxylase mRNA-containing neurons in the rat dentate gyrus following pilocarpine-induced seizures." *The Journal of Neuroscience*, **13**, 4470-4485.

Oertel, W. H., Schmechel, D. E., Tappaz, M. L., y Kopin, I. J. (1981). "Production of a specific antiserum to rat brain glutamic acid decarboxylase by injection of an antigen-antibody complex." *Neuroscience*, **6**, 2689-2700.

Olpe, H. R., Karlsson, G., Pozza, M. F., Brugger, F., Steinmann, M., Riezen, H. V., Fagg, G., Hall, R. G., Froestl, W., y Bittiger, H. (1990). "CGP 35348: a centrally active blocker of GABAB receptors." *European Journal of Pharmacology*, **187**, 27-38.

Olsen, R. W. (1981). "GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions." *Journal of Neurochemistry*, **37**, 1-13.

Olsen, R. W. (1987). "The  $\gamma$ -aminobutyric acid/benzodiazepine/barbiturate receptor chloride ion channel complex of mammalian brain, in synaptic function." Synaptic Function, G. M. Edelman, W. E. Gall, y W. M. Cowan, eds., Neuroscience Research Foundation/John Wiley and sons, U.S.A., 257-271.

Olsen, R. W., McCabe, R. T., y Wamsley, J. K. (1990). "GABAA receptor subtypes: autoradiographic comparison of GABA, benzodiazepine, and convulsant binding sites in the rat central nervous system." *Journal of Chemical*

*Neuroanatomy*, **3**, 59-76.

Olsen, R. W., y Venter, J. (1986). "Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels: structural and functional properties." *Receptor Biochemistry and Methodology*, R. W. Olsen and J. Venter, eds., Alan R. Liss, New York, U.S.A.

Olsen, R. W., Wamsley, J. K., McCabe, R. T., Lee, R. J., y Lomax, P. (1985). "Benzodiazepine/ $\gamma$ -aminobutyric acid receptor deficit in the midbrain of the seizure-susceptible gerbil." *Proceedings of National Academic Sciences USA*, **82**, 6701-6705.

Ong, J., Harrison, N. L., Hall, R. G., Barker, J. L., Johnston, G. A. R., y Kerr, D. I. B. (1990). "3-Aminopropanephosphonic acid is a potent agonist at peripheral and central presynaptic GABAB receptors." *Brain Research*, **526**, 138-142.

Ortiz, J. G., Negrón, A. E., García, M. T., Rosado, J. E., y Maldonado, C. S. (1990). "The C57BL/10Bg sps/sps mouse: a mutant with absence-like seizures; neurochemical and behavioral correlates." *Neuroscience Letters*, **114**, 231-236.

Paxinos, G., y Watson, C. (1986). "The rat brain in stereotaxic coordinates", Academic Press, Sidney.

Pedneault, S., y Soghomonian, J.-J. (1994). "Glutamate decarboxylase (GAD65) mRNA levels in the striatum and pallidum of MPTP-treated monkeys." *Molecular Brain Research*, **25**, 351-354.

Peterson, G. M., Ribak, C. E., y Oertel, W. H. (1985). "A regional increase in the number of hippocampal GABAergic neurons and terminals in the seizure-sensitive gerbil." *Brain Research*, **340**, 384-389.

Piredda, S., y Gale, K. (1986). "Role of excitatory amino acid transmission in the genesis of seizures elicited from the deep preopiriform cortex." *Brain Research*, **377**, 205-210.

Popovici, T., Represa, A., Crepel, V., Barbin, G. Beaudoin, M., y Ben-Ari, Y. (1990). "Effects of kainic acid-induced seizures and ischemia on c-fos like-proteins in rat brain." *Brain Research*, **536**, 183-194.

Porter, T. G., y Martin, D. L. (1984). "Evidence for feedback regulation of glutamate decarboxylase by gamma-aminobutyric acid." *Journal of Neurochemistry*, **43**, 1464-1467.



Pritchett, D. B., Sontheimer, H., Shivers, B. D., Ymer, S., Kettenmann, H., y Schofield, P. R. S., P. (1989). "Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology." *Nature*, **338**, 582-585.

Puia, G., Santi, M., Vicini, S., Pritchett, D. B., Purdy, R. H., Paul, S. M., Seeburg, P. H., y Costa, E. (1990). "Neurosteroids act on recombinant human GABAA receptors." *Neuron*, **4**, 759-765.

Reigel, C. E., Dailey, J. W., y Jobe, P. C. (1986). "The genetically epilepsy-prone rat: an overview of seizure-prone characteristics and responsiveness to anticonvulsant drugs." *Life Sciences*, **39**, 763-774.

Rimvall, K., y Martin, D. L. (1992). "Increased intracellular gamma-aminobutyric acid selectively lowers the level of the larger of two glutamate decarboxylase proteins in cultured GABAergic neurons from rat cerebral cortex." *Journal of Neurochemistry*, **58**, 158-166.

Rimvall, K., y Martin, D. L. (1994). "The level of GAD-67 protein is highly sensitive to small increases in intraneuronal  $\gamma$ -aminobutyric acid levels." *Journal of Neurochemistry*, **62**, 1375-1381.

Robbins, R. J., Brines, M. L., Kim, J. H., Adrian, T., de Lanerolle, N., Welsh, S., y Spencer, D. D. (1992). "A selective loss of somatostatin in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy." *Annals of Neurology*, **29**, 325-332.

Robello, M., Baldelli, P., y Cupello, A. (1994). "Modulation by extracellular pH of the activity of GABAA receptors on rat cerebellum granule cells." *Neuroscience*, **61**, 833-837.

Roberts, R. C., Kim, H. L., y Ribak, C. E. (1985a). "Increased numbers of neurons occur in the inferior colliculus of the young genetically epilepsy-prone rat." *Brain Research*, **355**, 277-281.

Roberts, R. C., Ribak, C. E., y Oertel, W. H. (1985b). "Increased numbers of GABAergic neurons occur in the inferior colliculus of an audiogenic model of genetic epilepsy." *Brain Research*, **361**, 324-338.

Romijn, H. J., Marle, J. V., y Janszen, A. W. J. W. (1993). "Permanent increase of the GAD67/synaptophysin ratio in rat cerebral cortex nerve endings as a result of hypoxic ischemic encephalopathy sustained in early postnatal life: a

confocal laser scanning microscopic study." *Brain Research*, **630**, 315-329.

Rothe, T., Middleton-Price, H., y Bigl, V. (1988). "The ontogeny of GABA receptors and glutamic acid decarboxylase in regions of the rat brain." *Neuropharmacology*, **27**, 661-667.

Saffen, D. W., Cole, A. J., Worley, P. F., Christy, B. A., Ryder, K., y Baraban, J. M. (1988). "Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain." *Proceedings of National Academic Sciences USA*, **85**, 7795-7799.

Saji, M., Cohen, M., Blau, A. D., Wessel, T. C., y Volpe, B. T. (1994). "Transient forebrain ischemia induces delayed injury in the substantia nigra reticulata: degeneration of GABA neurons, compensatory expression of GAD mRNA." *Brain Research*, **643**, 234-244.

Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S., y Tapia, R. (1994). "Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of  $\gamma$ -aminobutyric acid." *Neurochemical International*, **24**, 363-368.

Salin, P., y Chesselet, M.-F. (1993). "Expression of GAD (Mr 67 000) and its messenger RNA in basal ganglia and cerebral cortex after ischemic cortical lesions in rats." *Experimental Neurology*, **119**, 291-301.

Sato, K., Morimoto, K., Okamoto, M., Nakamura, Y., Otsuki, S., y Sato, M. (1990). "An analysis of anticonvulsant actions of GABA agonists (progabide and baclofen) in the kindling model of epilepsy." *Epilepsy Research*, **5**, 117-124.

Schmidt-Kastner, R., Heim, C., y Sontag, K.-H. (1991). "Damage of substantia nigra pars reticulata during pilocarpine-induced status epilepticus in the rat: immunohistochemical study of neurons, astrocytes and serum-protein extravasation." *Experimental Brain Research*, **86**, 125-140.

Schmidt-Kastner, R., Wietasch, K., Weigel, H., y Eysel, U. T. (1993). "Immunohistochemical staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) after deafferentation or ischemic infarction in rat visual system: features of reactive and damage astrocytes." *International Journal of Developing Neuroscience*, **11**, 157-174.

Schofield, P. R., Darlinson, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A.,

Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachyran, J., Reale, V., Glencorse, T. A., Seeburg, P. H., y Barbard, E. A. (1987). "Sequence and functional expression of the GABAA receptor shows the ligand-gated receptor superfamily." *Nature*, **328**, 221-227.

Schousboe, A., Westergaard, N., Sonnewald, U., Petersen, S. B., Yu, A. C., y Hertz, L. (1992). "Regulatory role of astrocytes for neuronal biosynthesis and homeostasis of glutamate and GABA." *Progress in Brain Research*, **94**, 199-211.

Schulz, M. K., Hya, R. J., Tillotson, G. L., y Castro, A. J. (1994). "Expression of c-fos mRNA and c-fos protein in neocortical transplants placed into excitotoxin-induced lesions in adult rats." *Experimental Neurology*, **129**, 321-329.

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

Shehab, S., Coffey, P., Dean, P., y Redgrave, P. (1992). "Regional expression of fos-like immunoreactivity following seizures induced by pentylenetetrazole and maximal electroshock." *Experimental Neurology*, **118**, 261-174.

Sheng, M., y Greenberg, M. E. (1990). "The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system." *Neuron*, **4**, 477-485.

Shi, Y., Veit, B., y Baekkeskov, S. (1994). "Amino acid residues 24-31 but not palmitoylation of cysteines 30 and 45 are required for membrane anchoring of glutamic acid decarboxylase, GAD-65." *The Journal of Cell Biology*, **124**, 927-934.

Shin, C., McNamara, J. O., Morgan, J. I., Curran, T., y Cohen, D. R. (1990). "Induction of c-fos mRNA expression by after-discharge in the hippocampus of naive and kindled rats." *Journal of Neurochemistry*, **55**, 1050-1055.

Shin, C., Pedersen, H. B., y McNamara, J. O. (1985). "γ-aminobutyric acid and benzodiazepine receptors in the kindling model of epilepsy: a quantitative radiohistochemical study." *Journal of Neuroscience*, **5**, 2696-2701.

Shivers, B. D., Killish, I., Sprengel, R., Sontheimer, H., Kohler, M., Schofield, P. R., y Seeburg, P. H. (1989). "Two novel GABAA receptor subunits exist in distinct neuronal subpopulations." *Neuron*, **3**, 327-337.

Sigel, E., Baur, R., Kellenberger, S., y Malherbe, P. (1992). "Point mutations affecting antagonist and agonist dependent gating of GABAA receptor channels." *EMBO*, **11**, 2017-2023.

Sigel, E., Baur, R., Trube, G., Mohler, H., y Malherbe, P. (1990). "The effect of subunit composition of rat brain GABAA receptors on channel function." *Neuron*, **5**, 703-711.

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

Silva-Barrat, C., Araneda, S., Menini, C., Champagnat, J., y Naquet, R. (1992). "Burst generation in neocortical neurons after GABA withdrawal in the rat." *Journal of Neurophysiology*, **67**, 715-727.

Silva-Barrat, C., y Champagnat, J. (1995). "A potassium current controls burst termination in rat neocortical neurons after GABA withdrawal." *Neuroscience Letters*, **189**, 105-108.

Silva-Comte, C., Velluti, J., y Menini, C. (1982). "Characteristics and origin of frontal paroxysmal responses induced by light stimulation in the *Papio papio* under allylglycine." *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **53**, 479-490.

Silver, J., Lorenz, S. E., Wahlsten, D., y Coughlin, J. (1982). "Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways." *Journal of Comparative Neurology*, **210**, 10-29.

Simler, S., Hirsch, E., Danober, L., Motte, J., Vergnes, M., y Marescaux, C. (1994). "C-fos expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats." *Neuroscience Letters*, **175**, 58-62.

Simonato, M., Hosford, D. A., Labiner, D. M., Shin, C., Mansbach, H. H., y McNamara, J. O. (1991). "Differential expression of immediate early genes in the hippocampus in the kindling model of epilepsy." *Molecular Brain Research*, **11**, 115-124.

Snyder-Keller, A. M., y Pierson, M. G. (1992). "Audiogenic seizures induce c-fos in a model of developmental epilepsy." *Neuroscience Letters*, **135**, 108-112.

Soghomonian, J.-J., y Chesselet, M.-F. (1992). "Effects of nigrostriatal lesions on the levels of messenger RNAs encoding two isoforms of glutamate decarboxylase in the globus pallidus and entopeduncular nucleus of the rat." *Synapse*, **11**, 124-133.

Soghomonian, J.-J., Pedneault, S., Audet, G., y Parent, A. (1994). "Increased glutamate decarboxylase mRNA levels in the striatum and pallidum of MPTP-treated primates." *The Journal of Neuroscience*, **14**, 6256-6265.

Sonnenberg, J. L., Frantz, G. D., Lee, S. H., Heick, A., Chu, C., Tobin, A. J., y Christakos, S. (1991). "Calcium-binding protein (Calbindin-D28K) and glutamate-decarboxylase gene-expression after kindling induced seizures." *Molecular Brain Research*, **9**, 179-190.

Sonnenberg, J. L., Macgregor-Leon, P. F., Curran, T., y Morgan, J. I. (1989a). "Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure." *Neuron*, **3**, 359-365.

Sonnenberg, J. L., Mitchelmore, C., Macgregor-Leon, P. F., Hempstead, J., Morgan, J. I., y Curran, T. (1989b). "Glutamate receptor agonists increase the expression of fos, fra and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain." *Journal of Neuroscience Research*, **24**, 72-80.

Sternberger, L. A. (1986). *Immunocytochemistry*, Wiley, New York.

Steward, O. (1994). "Electroconvulsive seizures upregulate astroglial gene expression selectively in the dentate gyrus." *Molecular Brain Research*, **25**, 217-224.

Swinyard, E. A. (1972). "Electrically induce convulsions In:." "Experimental models of epilepsy-a manual for the laboratory worker", D. P. Purpura, J. K. Penry, D. M. Woodbury, D. B. Tower, y R. D. Walter, eds., Raven Press, New York, 435-458.

Taguchi, J., y Kuriyama, K. (1984). "Purification of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptor from rat brain by affinity column chromatography using a new benzodiazepine, 1012-S, as an immobilized ligand." *Brain Research*, **323**, 219-226.

Tapia, R. (1991). "Alteraciones neuroquímicas asociadas a las epilepsias." *Epilepsia experimental*, S. Brailowsky y E. Otero-siliceo, eds., Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y Academia Mexicana de Neurología, México, D. F., 37-45.

Tapia, R., Drucker-Colin, R. R., Meza-Ruiz, G., Durán, L., y Levi, G. (1979). "Neurophysiological and neurochemical studies on the action of the anticonvulsant *g*-phenyl-butyramide." *Epilepsia*, **20**, 135-145.

Taylor-Couval, D., y Gloor, P. (1984). "Behavioral alterations associated with generalized spike and wave discharges in the EEG of the cat." *Experimental Neurology*, **83**, 167-186.

Thompson, C. L., y Stephenson, F. A. (1994). "GABAA receptor subtypes expressed in cerebellar granule cells: a developmental study." *Journal of Neurochemistry*, **62**, 2037-2044.

Ticku, M. K. (1991). "Drug modulation of GABAA-mediated transmission." *Seminars in Neuroscience*, **3**, 211-218.

Tillakaratne, N. J. K., Erlyer, M. G., Collard, M. W., Greif, K. F., y Tobin, A. J. (1992). "Glutamate decarboxylases in nonneural cells of rat testis and oviduct: differential expression of GAD65 and GAD67." *Journal of Neurochemistry*, **58**, 618-627.

Torre, E. R., Lothman, E., y Steward, O. (1993). "Glial response to neuronal activity: GFAP-mRNA and protein levels are transiently increased in the hippocampus after seizures." *Brain Research*, **631**, 256-264.

Turski, W. A., Cruzwar, S. J., Kleinrok, Z., y Turski, L. (1983). "Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats." *Experientia*, **39**, 1408-1411.

Tyndale, R. F., Hales, T. G., Olsen, R. W., y Tobin, A. J. (1994). "Distinctive patterns of GABAA receptor subunit mRNAs in 13 cell lines." *The Journal of Neuroscience*, **14**, 5417-5428.

Verdoorn, T. A., Draguhn, A., Ymer, S., Seeburg, P. H., y Sakmann, B. (1990). "Functional properties of recombinant rat GABAA receptors depend upon subunit composition." *Neuron*, **4**, 919-928.

Wallenstein, G. V. (1994). "The role of thalamic I GABAB in generating

spike-wave discharges during petit mal seizures." *Neuroreport*, **5**, 1409-1412.

Weiland, N. G. (1992). "Glutamic acid decarboxylase messenger ribonucleic acid is regulated by estradiol and progesterone in the hippocampus." *Endocrinology*, **131**, 2697-2702.

Williams, M. B., y Jope, R. S. (1994). "Distinctive rat brain immediate early responses to seizures induced by lithium plus pilocarpine." *Molecular Brain Research*, **25**, 80-89.

Wisden, W., Laurie, D. J., Monyer, H., y Seeburg, P. H. (1992). "The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon." *The Journal of Neuroscience*, **12**, 1040-1062.

Woodburn, V. L., Oles, R., Poat, J., Woodruff, G. N., y Hughes, J. (1993). "Anticonvulsant agents, dizocilpine maleate, enadoline y HA 966 have different effects on N-methyl-DL-aspartate-induced immediate early gene induction in mice." *Neuroscience*, **56**, 703-709.

Wyborski, R. J., Bond, R. W., y Gottlieb, D. I. (1990). "Characterization of a cDNA coding for rat glutamic acid decarboxylase." *Molecular Brain Research*, **8**, 193-198.

Yamamoto, C. (1972). "Intracellular study of seizure-like after discharges elicited in thin hippocampal sections in vitro." *Experimental Neurology*, **35**, 154-164.

Yount, G. L., Ponsalle, O., y White, J. D. (1994). "Pentylentetrazole-induced seizures stimulate transcription of early and late response genes." *Molecular Brain Research*, **21**, 219-224.

Zielinski, F. F. (1988). "Epidemiologia." A textbook of epilepsy, J. Laidlaw, A. Richens, y J. Oxley, eds., Churchill Livingstone, Edinburgh, 21-48.