



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EXPRESION DE LA DESCARBOXILASA DEL ACIDO  
GLUTAMICO (GAD) EN EL GIRO DENTADO DEL  
HIPOCAMPO DE LA RATA".

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :  
M O N I C A R A M I R E Z R U A N O

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL GUTIERREZ AGUILAR



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Expresión de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en el giro dentado del  
hipocampo de la rata.

realizado por Mónica Ramírez Ruano

con número de cuenta 9554234-6 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar

Propietario

Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoitia

Propietario

Dr. Ramón Alvarado Alvarez

Suplente

M. en C. Miguel Asai-Camacho

Suplente

Biól. Alejandro Heredia Barbero

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología



Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

### **Agradecimientos:**

A mi familia

A mis amigos

Al director de tesis

A mis compañeros de laboratorio

### **Agradecimientos técnicos:**

Al Dr. Benito Antón Palma por su ayuda en el establecimiento de la técnica inmunohistoquímica.

A los Srs. Juan Rivera y Angel Marrufo por su apoyo en el revelado de las fotos que ilustran este trabajo.

Al Psic. Héctor Romo Parra por sus comentarios y sugerencias.

Al Biól. José Ayala Dávila

Los experimentos de este trabajo se realizaron en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. CINVESTAV y se conto con el apoyo de una beca para la elaboración de tesis de licenciatura financiada por el donativo de CONACyT 29309-N otorgado al Dr. R. Gutiérrez

## Abreviaturas

|         |                                                              |
|---------|--------------------------------------------------------------|
| ABC     | Complejo avidina-biotina                                     |
| ApoGAD  | Forma inactiva de la GAD                                     |
| ATP     | Trifosfato de adenosina                                      |
| BDNF    | Factor neurotrófico derivado del cerebro                     |
| CCG     | Crisis convulsivas generalizadas                             |
| DAB     | Diaminobenzidina                                             |
| FM      | Fibras musgosas                                              |
| GABA    | Ácido gamma-aminobutírico                                    |
| GABA-T  | GABA aminotransferasa                                        |
| GAD65   | Glutamato descarboxilasa 65 isoforma de menor peso molecular |
| GAD67   | Glutamato descarboxilasa 67                                  |
| GD      | Giro dentado                                                 |
| GluRA's | Antagonista a los receptores de glutamato                    |
| H       | Hilus                                                        |
| HoloGAD | Forma activa de la GAD                                       |
| i.p.    | intraperitoneal                                              |
| NGF     | Factor de crecimiento neural                                 |
| PBS     | Buffer salino de fosfatos                                    |
| PLP     | Fosfato de Piridoxal                                         |
| PTZ     | Pentilenetetrazol                                            |
| SSADH   | Semialdehído succínico deshidrogenasa                        |
| VGAT    | Transportador vesicular de GABA                              |
| v.o.    | vía oral                                                     |
| U.I.    | Unidades Internacionales                                     |

# INDICE

|                                                                        | Página |
|------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Resumen</b> .....                                                   | 1      |
| <b>Capítulo I Anatomía del Hipocampo</b> .....                         | 3      |
| 1.1. Introducción                                                      |        |
| 1.2. Células granulares                                                |        |
| 1.3. Células piramidales                                               |        |
| 1.4. Interneuronas                                                     |        |
| 1.5. Circuitos básicos                                                 |        |
| 1.6. Circuito trisináptico                                             |        |
| 1.7. Papel del GABA en el hipocampo                                    |        |
| <b>Capítulo II Metabolismo del GABA</b> .....                          | 10     |
| 2.1 Síntesis de GABA                                                   |        |
| 2.2. Isoformas de la GAD                                               |        |
| 2.3. Regulación de la síntesis de GABA                                 |        |
| 2.4. GABA y epilepsia                                                  |        |
| <b>Capítulo III Kindling</b> .....                                     | 17     |
| 3.1. Generalidades                                                     |        |
| 3.2. Características del estímulo eléctrico                            |        |
| 3.3. Áreas de estimulación                                             |        |
| 3.4. Cambios conductuales                                              |        |
| 3.5. Características filogenéticas                                     |        |
| 3.6. Bases celulares del kindling                                      |        |
| 3.7. Cambios funcionales, anatómicos y moleculares durante el kindling |        |
| <b>Capítulo IV</b>                                                     |        |
| 5.1. Justificación.....                                                | 25     |

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.Hipótesis.....                                                | 25        |
| 5.3 Objetivos .....                                               | 25        |
| <b>Capítulo V Material y Método .....</b>                         | <b>26</b> |
| 5.1 Preparación quirúrgica                                        |           |
| 5.2. Protocolo de estimulación eléctrica                          |           |
| 5.3. Crisis agudas provocadas por pentilenetetrazol               |           |
| 5.4. Grupos experimentales                                        |           |
| 5.5. Preparación del tejido                                       |           |
| 5.6. Inmunohistoquímica para la GAD                               |           |
| 5.7. Análisis histológico                                         |           |
| <b>Capítulo VI Resultados .....</b>                               | <b>30</b> |
| 6.1. Grupo control                                                |           |
| 6.2. Grupo con una sola crisis convulsiva                         |           |
| 6.3. Grupo epileptizado por kindling y procesado 24 horas después |           |
| 6.4. Grupo epileptizado por kindling y procesado un mes después   |           |
| 6.5. Rebanas de hipocampo estimuladas a alta frecuencia           |           |
| <b>Capítulo VII Discusión .....</b>                               | <b>39</b> |
| <b>Referencias .....</b>                                          | <b>43</b> |

## Resumen

Existen evidencias electrofisiológicas que sugieren que las células granulares del giro dentado del hipocampo, que normalmente liberan glutamato (glutamatérgicas), también son capaces de liberar GABA después de la inducción de crisis convulsivas generalizadas. Esta hipótesis está apoyada por evidencias inmunohistoquímicas que muestran la presencia de la glutamato descarboxilasa (GAD), la enzima limitante de la síntesis de GABA, en estas células y su sobreexpresión después de crisis convulsivas. A partir de estas evidencias, en este trabajo me propuse determinar la correlación que existe entre el cambio en la excitabilidad neuronal, que da lugar a la transmisión simultánea de GABA y glutamato en la sinapsis de las fibras musgosas y la zona CA3, y la expresión de esta enzima en las células granulares del hipocampo.

Realicé la técnica inmunohistoquímica en ratas Wistar en las diferentes condiciones de excitabilidad en el sistema nervioso, en las que previamente se había comprobado la liberación simultánea de GABA y glutamato de las células granulares. Estas fueron: a) después de 5 crisis convulsivas generalizadas provocadas por el modelo de epilepsia experimental "kindling". Este consiste en la estimulación repetida de la amígdala del lóbulo temporal, que culmina, después de dos semanas, en crisis convulsivas generalizadas; b) después de una sola crisis provocada por una inyección intraperitoneal del convulsivante pentilinetetrazol (PTZ). c) un mes después de la última crisis convulsiva provocada por el modelo de kindling y d) después de 3 horas de estimulación iterativa *in vitro*, con un protocolo que potencia la transmisión sináptica pero que no induce actividad epileptiforme. Tras establecer estas condiciones, determiné la expresión de la isoforma de mayor peso molecular de la GAD, la GAD67.

Los resultados mostraron que 24 horas después de 5 crisis convulsivas consecutivas aumenta la inmunorreactividad de GAD67 en las células granulares del giro dentado y en las fibras musgosas. Por otro lado, en ratas que también fueron sometidas al procedimiento de kindling pero cuyo análisis

fue realizado un mes después de la última crisis, la inmunorreactividad a GAD67 se conserva en las fibras musgosas, sin embargo, el giro dentado presenta una inmunorreactividad similar a la que muestran las ratas control. Esto coincidió con la desaparición de la transmisión GABAérgica aberrante provocada por la crisis.

En el grupo de ratas que se inyectó para producir una crisis única se observó un incremento en la inmunorreactividad en las interneuronas de la base del giro dentado y en las fibras musgosas. El análisis inmunohistoquímico de la expresión de la GAD67 en rebanadas de hipocampo que fueron sometidas a un protocolo de estimulación iterativa *in vitro* por tres horas, sin inducir actividad epileptiforme, mostró un marcado intenso en las células granulares del giro dentado. Los diferentes patrones de inmunotinción observados en el giro dentado y en las fibras musgosas dependen del tiempo al que el sistema está sometido a hiperexcitabilidad. Así, una crisis convulsiva aislada induce la síntesis de GAD en las fibras musgosas y, para que su detección sea posible en los somas de las células granulares, se requiere de la presencia de un estado sostenido de hiperexcitabilidad, como el evocado por la estimulación *in vitro* repetida o por las crisis consecutivas.

## **Capítulo I. ANATOMÍA DEL HIPOCAMPO**

### **1.1. Introducción.**

El hipocampo forma parte de un grupo de estructuras del sistema límbico que en su conjunto se denominan "formación hipocampal". Comprende al giro dentado, el subiculum, el presubiculum, el parasubiculum, y la corteza entorrinal. Su arreglo celular e histológico, por capas bien definidas, hace que esta estructura sea muy utilizada para estudios anatómicos y electrofisiológicos (Figura 1).

Además de que esta estructura participa en los procesos de aprendizaje y memoria (Scoville y Milner, 1957), se ha demostrado que el hipocampo posee una alta susceptibilidad a presentar actividad epileptiforme en comparación con cualquier otra área del cerebro (Green, 1964). Muchos pacientes con epilepsia presentan crisis que involucran al hipocampo, y a menudo las crisis ahí originadas son las más difíciles de tratar con medicamentos.

El hipocampo puede ser claramente dividido en dos grandes regiones según Ramón y Cajal (1911) a las que denominó región inferior y superior. Sin embargo, Lorente de Nó (1934) dividió al hipocampo en tres campos (CA1, CA2 y CA3) para la zona piramidal y el campo CA4 que refiere a la región ocupada por la capa de células polimórficas del giro dentado, o hilus. Los campos CA2 y CA3 son equivalentes a la región inferior que identificó Ramón y Cajal, y CA1 es equivalente a la región superior. Además de las diferencias de tamaño de las células piramidales en CA3 y CA1, existe una clara diferencia en cuanto a sus conexiones. Las células piramidales de CA3 reciben entradas del giro dentado, pero no las de CA1.

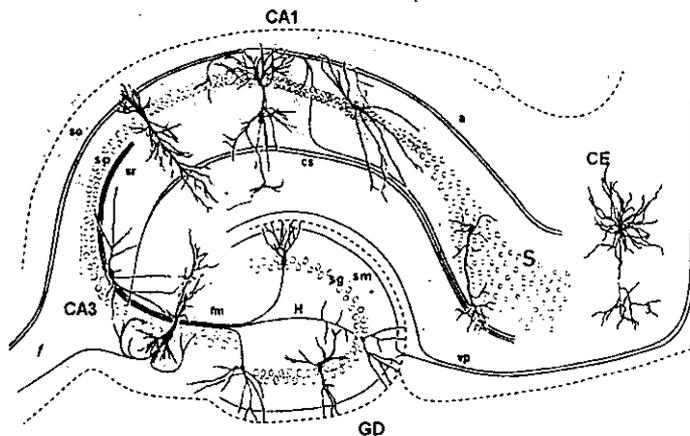


Figura 1. Esquema de la formación hipocampal. sm stratum moleculare; a alveus; sg stratum granular; so stratum oriens; sp stratum piramidale; sr stratum radiatum; fm fibras musgosas; vp vía perforante; H hilus; GD giro dentado, S subiculum; CE corteza entorrinal (tomado de Caesar y Artesen, 1991)

Las células principales del giro dentado son las células granulares y las del hipocampo propiamente dicho son las piramidales.

**1.2. Células granulares:**

El giro dentado está formado por tres capas, la principal o de células granulares, la capa molecular que está localizada sobre la capa granular y una capa difusa de células polimórficas, que es conocida como hilus, (Johnston y Amaral, 1998).

Las células granulares son pequeñas (aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) y de apariencia esférica, se encuentran acomodadas en una capa de 4 a 6 células de grosor. Las dendritas de las células granulares se extienden perpendicularmente de la capa granular hacia la capa molecular donde se reciben las conexiones sinápticas de varias fuentes. Los axones de las células granulares son llamados fibras musgosas por la apariencia de sus terminales sinápticas. Se originan de la porción basal del cuerpo de la célula, y se extienden dentro de la capa polimórfica (también llamada *hilus*) (Johnston y Amaral, 1998). Ahí en la capa polimórfica, las fibras musgosas hacen sinapsis sobre células musgosas y otras interneuronas, salen del *hilus* formando un haz de fibras que finalmente conforman el *stratum lucidum* de CA3. Esta proyección de las fibras musgosas finalmente hace sinapsis con las células piramidales e interneuronas de CA3.

### 1.3. Células piramidales:

Los cuerpos celulares de las neuronas piramidales están arreglados en un estrato ordenado de 3 a 6 células de grosor llamado capa piramidal. Estas neuronas tienen árboles dendríticos elaborados que se extienden perpendicularmente a la capa celular en ambas direcciones.

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

Las dendritas de las neuronas piramidales están cubiertas con espinas y son llamadas "prolongaciones espinosas", que están localizadas sobre las dendritas proximales de CA3 y reciben sinapsis de las fibras musgosas (Johnston y Amaral, 1998). Las células piramidales de CA3 son glutamatérgicas y proyectan, a su vez, a la zona CA1.

#### **1.4. Interneuronas:**

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

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

En la capa molecular se localizan interneuronas que reciben información de la vía perforante y que, a su vez, hacen contactos axo-axónicos sobre el segmento inicial del axón de las células granulares (Kosaka, 1983; Freund y Buzsáki, 1996). Existe también una gran variedad de interneuronas que se localizan en la capa polimórfica y algunas de estas neuronas tienen axones que permanecen en la capa polimórfica, mientras que otras inervan a las capas granular y molecular (Freund y Buzsáki, 1996).

Una clase de células que se encuentran en la capa polimórfica son llamadas células musgosas (Amaral, 1978). Estas son excitatorias, que sólo proyectan a la capa molecular del giro dentado en forma ipsilateral y contralateral. Mientras algunos investigadores han llamado a estas células interneuronas excitatorias, el hecho de que proyecten sus axones a largas distancias en ambos sitios del giro dentado podría excluirlas de ser consideradas como interneuronas. De hecho, estas neuronas tienden a no proyectar localmente sino más bien a niveles septotemporales del giro dentado.

Las interneuronas del hipocampo que se localizan en la capa piramidal, o cerca de ella, son clasificadas en tres grupos con base en sus objetivos sinápticos: a) células axo-axónicas, b) células en canasta y c) biestratificadas (Freund y Buzsáki, 1996), estas células hacen sinapsis sobre los segmentos iniciales de las neuronas piramidales y ejercen un fuerte control sobre la iniciación de los potenciales de acción. Las células en canasta hacen sinapsis sobre el soma de las células piramidales. Cada célula en canasta puede establecer múltiples contactos sobre una neurona piramidal formando lo que parece como una canasta dentro de la cual se encuentra el soma. Finalmente las células biestratificadas hacen contactos sinápticos sobre las dendritas basales y apicales de las neuronas piramidales. Aunque existe una pequeña superposición entre sus regiones objetivo, las dendritas de los tres tipos de células proyectan dentro del *stratum radiatum* y *stratum oriens* (Buhl y col., 1996; Halasy y col., 1996). Existe también una conexión inhibitoria entre estas interneuronas. Además, muchas interneuronas GABAérgicas contienen y liberan péptidos neuroactivos (péptido vasoactivo intestinal VIP, somatostatina y Neuropeptido Y; Freund y Buzsáki 1996).

El papel de las interneuronas GABAérgicas en el hipocampo es la regulación de interacciones complejas entre las células principales, que incluyen oscilaciones poblacionales, plasticidad, sincronización epiléptica, efectos hormonales y desarrollo cortical. El mejor ejemplo de este punto es el papel que tienen estas células en las oscilaciones poblacionales. Las conexiones inhibitorias comúnmente sincronizan a las interneuronas produciendo oscilaciones de varias frecuencias, incluyendo teta (5 Hz) y gamma (40 Hz) (Freund y Buzsáki, 1996).

### 1.5. Circuitos básicos:

El circuito básico de la formación hipocampal se conoce desde tiempos de Ramón y Cajal (1911), sin embargo, detalles finos han sido elucidados hasta hace algunos años Andersen y col. (1971) describieron una ruta unidireccional de progresión de las vías excitatorias que unen cada región de la formación hipocampal y acuñaron el término de "circuito trisináptico". La corteza entorrinal se considera como el punto de inicio del circuito, por donde entra la información sensorial que alcanza el hipocampo. La organización sináptica del hipocampo es más compleja que esta presentación esquemática, sin embargo, ésta es útil para introducirse al estudio de esta estructura.

### 1.6. Circuito trisináptico del hipocampo:

La secuencia trisináptica es la siguiente: las fibras de la vía perforante emergen de las células estrelladas y piramidales en las capas II y III de la corteza entorrinal medial y lateral (Steward, 1976), pasan a través del complejo subicular y de la fisura hipocámpica, entran al giro dentado (GD) y terminan en los dos tercios externos de la capa molecular de esta estructura. Ahí forman sinapsis excitatorias sobre las espinas dendríticas de las células granulares, constituyendo así el primer relevo sináptico en el circuito. Las células granulares del GD envían sus axones (fibras musgosas) a la zona CA3 del hipocampo, pasando por el hilus, donde dejan colaterales, y forman el *stratum lucidum* a lo largo de la región CA3. En esta región las expansiones sinápticas de las fibras musgosas terminan sobre las prolongaciones espinosas localizadas en la parte proximal de las dendritas de las células piramidales de CA3 con las que forman sinapsis en “passant”. Esto constituye el segundo relevo sináptico (sinapsis asimétricas fibras musgosas- CA3). Las neuronas piramidales de la región CA3 envían sus axones a otros niveles de CA3 o bien hacia CA1. Cada axón envía una colateral mielinizada (colaterales de Schaffer) hacia la región CA1. En los *strata radiatum* y *oriens*, las colaterales de Schaffer forman sinapsis en “passant” sobre las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA1 integrando así el tercer relevo del circuito trisináptico.

Axones de las neuronas piramidales del CA1 proyectan a las neuronas del complejo subicular y a la parte profunda de la corteza entorrinal. Existe una proyección principal desde el subiculum a las capas profundas (V y VI) de la corteza entorrinal. Las capas profundas de la corteza entorrinal proyectan a sus capas superficiales (II y III) (Kohler y col., 1986) y éstas dan lugar a las fibras de la vía perforante. Así, la entrada de la vía perforante a las células granulares se origina en la corteza entorrinal, y la salida desde CA1 es en gran parte de la misma área, tanto por vía directa como por una vía subicular. Además de las conexiones sinápticas entre las diferentes regiones de la formación hipocámpica, existen también interacciones sinápticas complejas dentro de cada región. Estos circuitos locales consisten por lo menos de una neurona principal y una célula en canasta inhibitoria asociada, pero también puede incluir sinapsis excitatorias recurrentes. El sistema de excitación

recurrente está especialmente presente en la región CA3 ( Johnston y Brown, 1981; Miles y Wong, 1986) y está formado por axones colaterales de las neuronas piramidales que proyectan hacia sus vecinas. Las neuronas piramidales de la región CA3 también reciben una profusa inervación de las interneuronas (Miles y Wong, 1987; Griffith y col. 1986). Estimaciones basadas en registros pareados en rebanadas de cerebro transversales sugieren que cada neurona piramidal está inervada por más de 15 interneuronas inhibitorias (Miles y Wong, 1987).

El patrón de conexiones aferentes y eferentes de las distintas regiones de la formación hipocampal, sugieren que la región CA3 es el principal integrador de la formación hipocampal (Swanson y Cowan, 1977). Este es el intermediario entre la entrada de información al giro dentado y la salida del hipocampo, recibiendo el haz de proyecciones dentadas y enviando importantes tractos localmente, así como a otras áreas del cerebro. Además, se ha propuesto que el giro dentado funciona como un filtro limitando la transferencia de información de la corteza entorrinal a la capa piramidal del hipocampo (Heinemann y col., 1992).

### **1.7. Papel del GABA en el hipocampo**

En el hipocampo adulto, la salida de las células granulares y piramidales de las regiones CA1 y CA3 está fuertemente controlada por la actividad de las interneuronas GABAérgicas. El control es posible por tres mecanismos principales: a) la activación de los receptores postsinápticos de GABA que contrarresta la despolarización inducida por entradas directas despolarizantes (Miles y col., 1996), b) el receptor GABA media las respuestas sinápticas que pueden bloquear directamente el disparo del potencial de acción, y c) las interneuronas puede sincronizar el disparo de las neuronas principales durante las oscilaciones (Buzsáki y col., 1992; Csiesvari y col., 1999). Estos tres efectos de la inhibición GABAérgica en última instancia modifican la probabilidad del disparo de acción en la neurona postsináptica.

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

### 2.1. Síntesis de GABA

El ácido  $\gamma$ - aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio más abundante en el sistema nervioso central. Su síntesis se lleva a cabo por medio de una sola reacción catalizada por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) utilizando como precursor al L-glutamato (Figura 2).

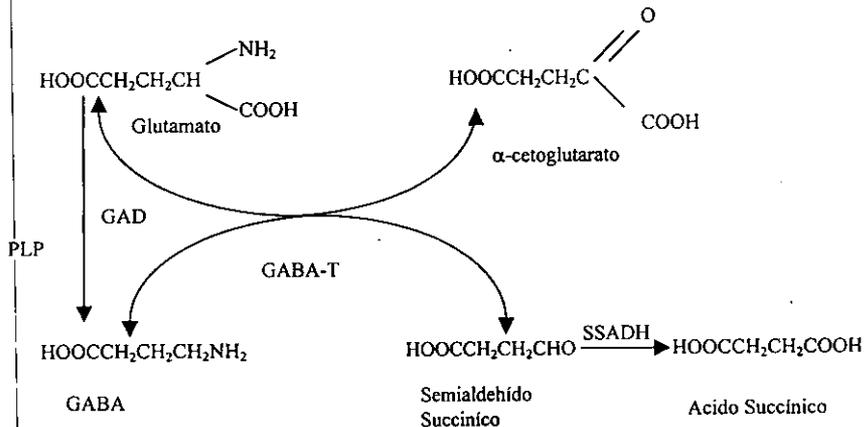


Figura 2 Formación del GABA a partir de ácido glutámico y su derivación o "shunt" al ciclo de Krebs. Tomado y modificado de Siegel 1989.

### 2.2. isoformas de la GAD

Se han caracterizado dos isoformas de la enzima GAD que difieren considerablemente en cuanto a su peso molecular (65 kD y 67 kD), localización intracelular, la interacción con su cofactor fosfato de piridoxal (PLP), así como el mecanismo de regulación de su síntesis (Martin y Rinvall, 1993).

La primera isoforma de la GAD fue obtenida del cerebro del gato y esta formada por 593 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 66,600, y es llamada GAD 67 (Kaufman, y col. 1986; Kobayashi y col 1987.)

El cDNA para la segunda isoforma de la GAD ha sido obtenido de tejido cerebral de rata y humano (Erlander y col., 1991; Bu y col., 1992), esta forma de la GAD esta compuesta por 585 aminoácidos y con un peso molecular aproximado de 65 400 D y es llamada GAD 65 (Chang y Gottlieb, 1988).

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

La localización intracelular de las dos isoformas de la GAD también difiere y se ha propuesto que esta compartimentalización puede tener un significado fisiológico. La GAD67 se localiza principalmente en los somas celulares y la GAD65 en terminales. Aunque las dos isoformas son capaces de sintetizar GABA, la GAD65 parece ser preferencialmente asociada con las sinapsis y su mRNA está presente en niveles elevados durante periodos de sinaptogénesis activa y durante el desarrollo del cerebelo y estriado (Greif y col., 1991). Los hallazgos que muestran que la GAD65 se encuentra predominantemente en las sinapsis han sugerido la hipótesis de que la GAD65 podría estar presente en las proyecciones de las neuronas con grandes axones, mientras que la GAD67 se encuentra principalmente en interneuronas. Con base en esta correlación se sugiere que las dos isoformas de la GAD juegan roles diferentes en los diferentes tipos de sinapsis (Feldblum y col., 1993). Por ejemplo, las neuronas con axones cortos tienden a tener una amplia arborización dendrítica y establecen comúnmente sinapsis dendrodendríticas, mientras que las neuronas con axones largos están más involucradas en las sinapsis axosomáticas o axodendríticas. La distribución del mRNA de las dos GAD en el bulbo olfatorio, ganglios basales y septum lateral apoyan esta

hipótesis. Sin embargo, en el hipocampo donde existe una gran diversidad morfológica de interneuronas GABAérgicas, el mRNA de las dos isoformas está presente y la pérdida de una obvia correlación entre los relativos niveles de los mRNA de las dos isoformas y la morfología es inconsistente con la hipótesis inicial (Feldblum y col.,1993).

Por otro lado, se ha mostrado que las células que contienen mRNA de la GAD67 también presentan altos niveles de hierro. Este metal es requerido como cofactor para la succínico deshidrogenasa, enzima que cataliza la entrada del succinato al ciclo del ácido cítrico, que proviene de la derivación de GABA. Esta correlación sugiere que la GAD67 esta más involucrada en este proceso que la GAD65.

Se considera que el GABA es capaz de actuar como metabolito, como factor neurotrófico, y como neurotransmisor. Este aminoácido no proteico se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso, y fuera del cerebro, en los islotes de células  $\beta$  pancreáticas pero en una menor concentración. (Rorsman y col., 1989).

Las investigaciones sobre la localización del GABA en el sistema nervioso se han facilitado enormemente debido a la utilización de la GAD como marcador específico de células GABAérgicas. Los anticuerpos generados contra la GAD pueden ser usados en procedimientos inmunohistoquímicos para mapear las neuronas y las terminales que contienen GABA (Pérez de la Mora y col. 1981).

La anatomía de las vías GABAérgicas ha sido elucidada en el sistema nervioso central no solo por la inmunotinción a GAD, sino también se ha utilizado inmunohistoquímica para GABA y para la GABA-T ( GABA aminotransferasa, enzima que inactiva al GABA). Sin embargo, la GABA-T está presente en astrocitos, así como en algunas neuronas. La marca inmunohistoquímica para GAD tiene prioridad sobre otras aproximaciones, considerando que las células que poseen GAD serían capaces de sintetizar GABA, en contraste es posible que algunas neuronas que expresan GABA-T no usen

GABA como neurotransmisor, como sucede con la acetilcolinesterasa que puede ser encontrada en algunas células que no son colinérgicas. Otra forma de identificar el fenotipo GABAérgico de una célula es mediante la presencia del transportador vesicular de GABA (VGAT), debido a que es necesaria la internalización del neurotransmisor a una vesícula para que pueda eventualmente ser liberado por exocitosis. Ésto lo realiza una proteína específica llamada transportador vesicular (Mc Intire y col., 1997; Reimer y col., 1998).

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

El GABA es inactivado por la GABA-T, que traslada el grupo amino del GABA al  $\alpha$ -cetoglutarato. El producto de esta reacción es el semialdehído succínico y glutamato, por lo que la degradación de GABA permite la regeneración de su precursor. La GABA-T es una enzima de 109 kD de peso molecular que, al igual que la GAD, requiere de fosfato de piridoxal como cofactor. La GABA-T se ha detectado en neuronas y en células gliales y se encuentra localizada cerca de la sinapsis, donde puede inactivar la liberación de GABA y metabolizar el neurotransmisor que está fuera de las vesículas sinápticas. El semialdehído succínico formado por la GABA-T es rápidamente oxidado a succinato por la enzima semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADH). Estudios de regulación sugieren que aproximadamente del 8% al 10% de toda la glucosa del cerebro es encauzada a la llamada derivación de GABA (Balazs y col., 1970; Baxter, 1976).

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

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

La localización de la GAD65 en las terminales nerviosas y la gran reserva de apoGAD65 (apoGAD, enzima que no se encuentra unida a su cofactor, es decir la forma inactiva) sugiere que la GAD65 se especializa en responder a cambios a corto plazo que demandan el neurotransmisor. Los niveles de apoGAD y de la holoenzima GAD (holoGAD) son controlados por un ciclo de reacciones que son reguladas fisiológicamente por concentraciones de ATP y otros polianiones y por fosfato inorgánico. Esto sugiere la posibilidad de que la actividad de la GAD se encuentre unida a la actividad neuronal a través del metabolismo energético (Martin y Rimvall, 1993).

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

La modulación de la síntesis de GABA ocurre a dos niveles: inmediato o también llamado regulación a corto plazo, y la regulación a largo plazo. La interacción de la GAD con su cofactor, PLP es un proceso altamente regulado que juega un papel importante en la regulación a corto plazo de la actividad de la GAD (Martin y Rimvall, 1993). La regulación de la GAD a largo plazo es compleja y numerosos estudios indican que los niveles de la proteína GAD y genes de la expresión de ésta, pueden ser regulados de muchas formas, incluyendo mecanismos transcripcionales y postrcripcionales (Szabo y col., 1996). El GABA podría ser capaz de regular la expresión de GAD67 a nivel postrricional, como el nivel de proteína GAD67 pero no de mRNA. En esta

línea se ha demostrado que la corteza cerebral es altamente sensible a cambios intracelulares de GABA (Rimvall y col., 1993; Rimvall y col., 1994). Diferencias en la regulación de las dos isoformas de la GAD y en su actividad indican que podrían estar involucradas en procesos diferentes de neurotransmisión mediada por GABA (Soghomonian y Martin, 1998).

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

#### **2.4. GABA y epilepsia**

La conservación del balance entre la excitación y la inhibición es esencial para el mantenimiento de las funciones normales del sistema nervioso central. La alteración en el balance de excitación-inhibición es uno de los factores que tienen más importancia en la etiología de la epilepsia, donde el GABA tiene un papel central (Schousboe, 1990). La inhibición de la síntesis de GABA produce crisis, así como la administración de antagonistas al receptor GABAA (Tapia, 1975).

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

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

La disminución de la inmunoreactividad a GAD en las interneuronas del hilus asociada al kindling parece ser solo transitoria (Babb et al., 1989). Además, se ha reportado un incremento a largo plazo en la actividad de la GAD en diversas áreas cerebrales después de la inducción de crisis por la administración intraperitoneal de ácido kaínico, que es un agente convulsivante. Los ratones transgénicos deficientes del gen que codifica para la GAD67 nacen con malformaciones en el paladar y mueren durante el primer día de vida al parecer de un paro respiratorio, y los niveles de GABA disminuyen (Kash et al, 1997). En contraste, los ratones deficientes para el gen de la GAD65 son viables, y conservan los niveles de GABA y GAD67 normales, pero presentan una alta susceptibilidad a presentar crisis y estas son tan severas que ocasionan la muerte (Asada y col., 1996).

## Capítulo III KINDLING

### 3.1. Generalidades

La epilepsia es un síndrome que aqueja aproximadamente a un 2% de la población mundial y debido a las limitaciones que existen para llevar a cabo estudios neurofisiológicos controlados en tejido epiléptico humano, se han diseñado modelos experimentales en otros mamíferos, que presentan características muy similares a las observadas en humanos. Entre éstos, uno de los más utilizados es el kindling.

El kindling o encendido es un término que se utiliza para describir el fenómeno en el que la estimulación repetida, eléctrica o química, de diversas estructuras del sistema límbico produce un incremento progresivo de su excitabilidad, que se propaga a otras regiones del sistema nervioso central hasta generar crisis convulsivas generalizadas (CCG) (Goddard y col., 1969).

Este fenómeno implica una alteración permanente en la actividad neuronal, ya que el estímulo con el que se produce es inicialmente subconvulsivante. Este estímulo es de baja intensidad (60-150  $\mu$ A) y provoca postdescargas que inicialmente son de corta duración (1-5 segundos); la frecuencia de las espigas de la postdescarga aumenta y se propagan a otras áreas del cerebro hasta generalizar la actividad epiléptica. Asimismo, los cambios conductuales que acompañan a dichas postdescargas se incrementan en número y en intensidad hasta culminar en crisis convulsivas generalizadas tónico clónicas. Esta estimulación, en lo sucesivo, será efectiva para tal fin por lo que puede considerarse que el estado epiléptico resultante es permanente.

El kindling como modelo experimental de epilepsia ofrece varias ventajas: a) es altamente reproducible, b) los cambios son irreversibles y permanentes, c) debido a su desarrollo gradual, permite el estudio de los cambios conductuales, electroencefalográficos, bioquímicos y moleculares en el curso de su evolución y d) debido a esta última característica, es un modelo ideal para el estudio de la epileptogénesis.

Se ha descrito en varios estudios que durante el desarrollo del kindling eléctrico se producen modificaciones en varias de las etapas de la neurotransmisión, como son: la síntesis del neurotransmisor, su liberación, su unión a los receptores postsinápticos y su degradación (Kalichman 1982; Bajorek y col.,1986).

### **3.2. Características del estímulo de inducción del kindling eléctrico:**

En el protocolo más usado para el kindling eléctrico, la estimulación se realiza con trenes de uno a dos segundos de duración con 60 pulsos de 0.1 ms de duración con baja intensidad (150  $\mu$ A-500  $\mu$ A), y se aplican cada 24 horas. Inicialmente esta estimulación no produce efectos conductuales o electroencefalográficos aparentes, pero con el tiempo provoca postdescargas que pueden llegar a tener una larga duración (60-100 segundos).

El tipo de estímulo es determinante para el desarrollo del kindling. Generalmente se aplica un tren de 60 Hz, pero a estímulos mayores en frecuencia, también inducen el kindling (i.e.150 Hz). Sin embargo, trenes de estimulación de menor frecuencia (10 Hz o menos) con duración de un segundo no son suficientes para su propagación (Goddard y col., 1969). Estímulos de larga duración (60s.) a intensidades bajas (menor a 0.875 Hz) son capaces de generar kindling, con la característica de que se requieren un menor número de estímulos (Caín y Corcoran, 1981).

El intervalo de aplicación de los estímulos, es también una variable importante en el establecimiento del kindling. Pulsos de 1ms a 60 Hz durante 1s a intervalos de 1 día o más, inducen kindling. Sin embargo, en animales estimulados a intervalos de 12 horas o menos (hasta 30 minutos) requieren de un mayor número de estímulos. Por otro lado, la administración continua de estímulos aplicados a intervalos menores de 20 minutos provoca una adaptación sin desarrollo de kindling (Goddard y col.,1969; Racine 1972).

### 3.3. Áreas de estimulación:

El kindling puede ser establecido en diferentes áreas del sistema límbico. Sin embargo, la región de estimulación no puede ser elegida indistintamente ya que el efecto kindling producido en cada especie será diferente (Goddard y col., 1969). En general, la estimulación más efectiva es la que se aplica en el sistema límbico, y en especial, en la amígdala del lóbulo temporal. También existen diferencias en el número de estímulos diarios para establecer el kindling. Se ha descrito que existen zonas más susceptibles para la obtención del kindling como son: corteza piriforme, amígdala e hipocampo. En contraste, existen algunas áreas del cerebro que requieren de más estímulos diarios para generar crisis convulsivas generalizadas (Goddard, 1978; Tabla 1).

| REGION                | NUMERO DE ESTIMULOS |
|-----------------------|---------------------|
| AMIGDALA              | 15                  |
| GLOBUS PALLIDUS       | 22                  |
| CORTEZA PIRIFORME     | 24                  |
| AREA OLFATORIA        | 29                  |
| ZONA LIMBICA ANTERIOR | 29                  |
| CORTEZA ENTORINAL     | 37                  |
| BULBO OLFATORIO       | 44                  |
| AREA SEPTAL           | 55                  |
| AREA PREOPTICA        | 63                  |
| CAUDADO PUTAMEN       | 74                  |
| HIPOCAMPO             | 77                  |

Tabla 1. Número de estímulos requeridos para producir la primera crisis convulsiva generalizada en diferentes regiones cerebrales en rata (tomada de Goddard, 1969).

### **3.4. Cambios conductuales:**

Los cambios generados por el kindling pueden ser evaluados por medio de fases o estadios conductuales o electrográficos de acuerdo a su severidad.

La siguiente clasificación presenta las manifestaciones conductuales observadas en ratas, agrupadas en fases de epileptización, que van progresando conforme se estimula eléctricamente al animal experimental (Racine, 1972).

Fase I. Guiño del ojo ipsilateral.

Fase II. Guiño bilateral y movimientos faciales (masticación).

Fase III. Movimientos de cabeza y faciales, sacudidas del perro mojado (WDS: Wet dog Shakes) y mioclonias de miembros anteriores.

Fase IV. Mioclonias de los miembros anteriores y posición de canguro.

Fase V. Levantamientos repetidos sobre las patas traseras, caída a suelo y CCG.

### **3.5. Características filogenéticas:**

La epileptización por el método de kindling ha sido inducido en rana, ratón, rata, conejo, perro, gato, mono rhesus, gerbo y babuino (Morrell y Tsuru, 1976; Rial y Gonzalez, 1978; Leech y McIntyre, 1976; Goddard y col., 1969).

Sin embargo, el tiempo de estimulación de una estructura determinada, requerido para provocar crisis generalizadas varía a lo largo de la escala filogenética (Wada y Osawa 1978). Independientemente del sitio de estimulación empleado en mamíferos, el kindling ocurre más rápidamente en la rata, seguido del gato, babuino y el mono, (datos mostrados en la tabla 2). También se ha observado que la severidad de las crisis varía con la especie, los gatos y los monos muestran convulsiones más severas que las ratas. (Mc Intyre, 1986, Racine, 1972).

| ESPECIES                                 | DIAS    |
|------------------------------------------|---------|
| <b>ESTIMULACION AMIGDALINA</b>           |         |
| Rata                                     | 8-12    |
| Gato                                     | 20-30   |
| Babuino                                  | 16-70   |
| Mono                                     | 150-200 |
| <b>ESTIMULACION NEOCORTICAL ANTERIOR</b> |         |
| Rata                                     | 35-40   |
| Gato                                     | 60-70   |
| Babuino                                  | 300     |

Tabla 2. Tiempo aproximado para el desarrollo del kindling en diferentes especies y áreas cerebrales.  
( Tomada de Joy, 1985)

### 3.6. Bases celulares del kindling:

Se ha descartado que el fenómeno del kindling sea producto de daño en el tejido cerebral causado por la implantación del electrodo de estimulación. Esto se comprobó al examinar con la tinción de Nissl el tejido proveniente de animales que se implantaron con un electrodo, y no se encontró diferencia en el tejido entre los animales implantados que no recibieron estimulación y los que sí se estimularon (Goddard y col.,1969). No se detectaron cambios morfológicos debido al kindling en las

células piramidales de la corteza de rata (Racine y col.,1975). El tejido adyacente al electrodo de estimulación contiene células piramidales que son normales en términos de tamaño, arborización dendrítica y en el número y tamaño de espinas dendríticas. Más aún, Goddard y Douglas (1975) examinaron el tejido cercano a la zona de estimulación en la amígdala usando técnicas de microscopía electrónica y no encontraron efectos degenerativos debidos a la implantación del electrodo. Así, con estos antecedentes puede asegurarse que el efecto del kindling es el resultado de la activación neuronal y no de daño en el tejido, edema, gliosis u otros procesos biológicos causados por esta manipulación (Goddard,1978).

### **3.7. Cambios funcionales, anatómicos y moleculares durante el kindling**

El kindling produce una serie de modificaciones a nivel molecular, morfológico y funcional en el sistema nervioso central, pero la formación hipocampal, particularmente el giro dentado, es reconocida como un región donde ocurren muchas alteraciones relacionadas con este fenómeno (Mody y col., 1990). Estas modificaciones ocurren a varios niveles, alteraciones en el metabolismo y niveles de  $Zn^{++}$  (Buhl y col., 1996; McGinty y col., 1988), en la expresión de neurotrofinas y un incremento de forma transitoria del mRNA que codifica para el NGF y BDNF (Isackson y Gall, 1989; Ernfors y col.,1991; Sato y col.,1996). Estudios anatómicos han mostrado que tanto la epilepsia humana como los modelos experimentales inducen un aumento en el número de ramificaciones de las fibras musgosas, fenómeno conocido como "sprouting" (Babb y col.,1991; Isokawa, y col., 1993; Represa y col., 1993; Cavazos y Sutula, 1990; Qiao y Noebels, 1993). Otros cambios comprenden modificaciones en el contenido y liberación de péptidos opiodes (Vindrola y col., 1981; Talavera y col., 1989), la inducción de genes tempranos (Dragunow y Robertson, 1988), la regulación y transcripción de genes de péptidos opiodes y factores de transcripción (Przewlocki y col., 1995), cambios en la homeostasis del  $Ca^{++}$  y de flujos iónicos (Mody y Soltesz, 1993; Mody, y col.,1994) y un incremento en la expresión de la GAD (Lehman y col.,1996). Se han observado alteraciones en la expresión de los receptores metabotrópicos al glutamato del grupo I en el hipocampo (Akbar y col., 1996). También se presenta una disminución del número de interneuronas GABAérgicas del hilus como consecuencia de la estimulación (Sloviter y col., 1987).

Recientemente, por medio de técnicas electrofisiológicas se demostró que las crisis convulsivas producidas por kindling amigdalino o por administración de PTZ inducen transmisión GABAérgica y glutamatérgica simultánea de las células granulares sobre sus células blanco (Gutiérrez, 2000; Gutiérrez y Heinemann, 2001; (Figura 3). Lo cual apoya fuertemente la posibilidad de que las células granulares coliberen glutamato y GABA.

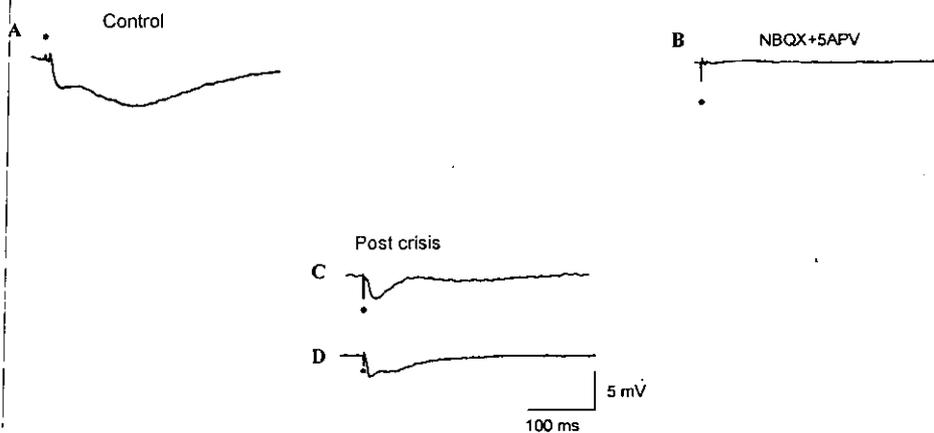


Figura 3. A. Respuestas sinápticas de una célula piramidal evocada por la estimulación del giro dentado, en situación control. B. Los potenciales sinápticos son bloqueados por la perfusión de antagonistas a receptores al glutamato (GluRA's en preparaciones control. En preparaciones de animales que se les indujo una crisis convulsiva por Pentilenetetrazol (C) o en animales que fueron sometidos a un proceso de epileptización conocido como kindling (D) y tras la perfusión de GluRA's se aísla un potencial inhibitorio rápido de corta latencia (modificado de Gutiérrez, 2000)

(•) artefacto de estimulación

#### 4.1. JUSTIFICACIÓN

Las células granulares del giro dentado del hipocampo son glutamatérgicas, sin embargo, contienen GAD, enzima limitante para la síntesis de GABA (Sloviter y col., 1996; Lehmann y col., 1995; Sandler y Smith 1991). Además, después de crisis convulsivas se ha observado un incremento de la expresión de GAD (Sloviter y col., 1996; Lehman y col., 1995; Schwarzer y Sperk, 1995) y la aparición de transmisión simultánea de GABA y glutamato en la sinapsis del giro dentado y células piramidales de CA3 (Gutiérrez, 2000; Gutiérrez y Heinneman, 2001). A partir de estas evidencias, se ha propuesto la hipótesis de que las células granulares del giro dentado pueden coliberar GABA y glutamato después de la inducción de crisis convulsivas por el modelo de kindling. Sin embargo, una sola crisis también induce la liberación simultánea de estos aminoácidos y no se sabe si una sola crisis es capaz de inducir un incremento de GAD. Al mismo tiempo la estimulación *in vitro*, que produce una potenciación, pero no crisis convulsivas, también induce la liberación simultánea. Con base en esto, si la liberación simultánea de GABA y glutamato depende de la excitabilidad y si es cierto que la síntesis de GABA también depende de ésta, deberemos observar que la GAD se regula por la excitabilidad, independientemente de la presencia de crisis.

## **4.2. HIPÓTESIS**

La transmisión GABAérgica y glutamatérgica simultánea en la sinapsis de las fibras musgosas del giro dentado y las células piramidales de la zona CA3 del hipocampo, inducida por crisis convulsivas o por estimulación repetitiva no epileptogénica *in vitro*, deberá coincidir con un aumento en la expresión de GAD en las células granulares del giro dentado.

## **4.3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el curso temporal de la sobreexpresión de GAD en el giro dentado de la rata, con técnicas inmunohistoquímicas y su correlato con los hallazgos electrofisiológicos.

## **4.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar la expresión de GAD en animales normales
- Analizar la expresión de GAD en animales epileptizados por el método de kindling 1 y 30 días después de la última crisis.
- Determinar la expresión de GAD en animales a los que se les indujo una crisis aguda por administración de pentilinetetrazol.
- Analizar la expresión de GAD en rebanadas de hipocampo estimuladas a alta frecuencia.

## Capítulo V. MATERIAL Y MÉTODO

Se realizaron experimentos de inmunocitoquímica a la GAD67 en tejido de ratas Wistar. Se utilizaron 15 ratas macho de 250 a 300g de peso, mantenidas en condiciones controladas de temperatura y luz, con agua y alimento sin restricción.

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

#### Preparación quirúrgica

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

#### Protocolo de estimulación eléctrica

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

## 5.2. Crisis agudas provocadas por pentilinetetrazol

Se administró el agente convulsivante pentilinetetrazol (PTZ) en una inyección única (60mg/kg i.p.). Esto produce una crisis convulsiva generalizada de alrededor de 2 minutos de duración. Los animales sometidos a este procedimiento se sacrificaron 2 o 24 horas después de la crisis convulsiva.

## 5.3. Grupos experimentales:

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

- 1) Grupo control-I: 2 ratas que no fueron implantadas y que no recibieron ningún tratamiento.
- 2) Grupo control-II: 2 ratas implantadas con un electrodo de estimulación en la amígdala izquierda, que no fueron estimuladas.
- 3) Grupo kindling-I: 4 ratas que se implantaron con un electrodo en amígdala izquierda y que se estimularon hasta generar cinco crisis generalizadas. Los experimentos inmunohistoquímicos se realizaron y se procesaron 24 horas después de la última crisis.
- 4) Grupo kindling-II: 3 ratas que se implantaron con un electrodo y que se estimularon hasta generar cinco crisis generalizadas. Los experimentos inmunohistoquímicos se realizaron 30 días después de la última crisis.
- 5) Grupo PTZ: 4 ratas a las que se les produjo una crisis convulsiva generalizada única con una inyección de pentilinetetrazol (PTZ). Los experimentos inmunohistoquímicos se realizaron 2 horas (2 ratas) y 24 horas (2 ratas) después de la crisis

Finalmente se realizaron experimentos inmunohistoquímicos en 3 rebanadas combinadas de corteza entorrinal-hipocampo a las que se les sometió a un protocolo de estimulación eléctrica *in vitro*. Este protocolo indujo potenciación a largo plazo de las respuestas sinápticas sin evocar actividad

epileptiforme. Este consistió en 12 estimulaciones de la vía perforante, con un intervalo de 15 minutos entre ellas. Cada estimulación consistió en tres trenes de 1 s de duración con pulsos de 0.1ms de duración a 100 Hz con un intervalo de 1 minuto entre ellos.

#### **5.4. Preparación del tejido para los estudios inmunohistoquímicos.**

Los animales fueron anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico (Anestosal 50 mg/kg i.p.) y se perfundieron vía intracardiaca con 25 ml de buffer fosfatos 0.1 M (pH 7.4) y heparina (Lab Piza 600µL/litro de solución), y posteriormente con 500ml de paraformaldehído 4% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 a 4°C. Posteriormente se extrajeron los cerebros y se colocaron en 20 ml de la solución fijadora durante dos horas y después se trasladaron a una solución de sacarosa al 30% en buffer de fosfatos, para su crioprotección en donde permanecieron por 36 horas a 4 °C.

Los cortes se obtuvieron en un microtomo de deslizamiento (Jung Histoslide 2000R. Leica.) el cerebro se colocó en posición antero-posterior sobre la base de hielo y se congeló a -20°C. Se realizaron cortes coronales de 30 µm de grosor, y se colectaron en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4.

#### **5.5. Inmunohistoquímica para la GAD**

La inmunohistoquímica contra la GAD67 se realizó por libre flotación. Se lavaron los cortes durante 15 minutos en PBS, posteriormente se incubaron en una solución de 0.3%, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena durante 10 minutos (excepto para las rebanadas combinadas de corteza entorrinal-hipocampo que fueron incubadas 5 minutos más). Se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS y después se incubaron en la solución de bloqueo (10% de suero normal de caballo, 1% de gelatina y 0.3 % de triton x-100). Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo policlonal a una dilución 1:1000 (en los animales con kindling el título del anticuerpo

fue 1:1500; Chemicon No. Cat. AB 108) en PBS y 5% de suero, durante 36 horas a 4°C con agitación constante. Se lavaron los cortes 4 veces durante 10 minutos y después se incubaron con el segundo anticuerpo anticonejo IgG biotinilado (Amersham Pharmacia Biotech RPN 1004) en una dilución 1:800. Se lavaron los cortes 4 veces por 10 minutos y se procesaron con el Kit ABC (Vectastain, Vector, Labs.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron los cortes 4 veces por 10 minutos y se reveló (se utilizó como sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y como cromógeno diaminobenzidina). La solución de revelado consistió en diaminobenzidina (DAB 10 mg / 25 ml PBS 10 mM) y sulfato de níquel (30%) y los cortes se incubaron por 10 minutos (excepto las rebanadas combinadas de corteza-hipocampo que sólo fueron incubadas la mitad del tiempo). La reacción enzimática se detuvo con agua destilada. Finalmente se montaron los cortes sobre los portaobjetos y se cubrieron con resina entellan (Merck).

#### **5.6. Análisis histológico:**

Los cortes se analizaron con un microscopio invertido (Axiovert-100 Zeiss). La inmunorreactividad de la GAD se observa como una marca oscura que destaca del fondo blanco en las diversas zonas del hipocampo. Los resultados se ilustran con fotomicrografías obtenidas a diversos aumentos (indicados en la sección de resultados, según corresponda), con una cámara fotográfica MC 80 DX.

## **Capítulo VI. RESULTADOS**

En todos los experimentos se procesó al paralelo tejido que no fue incubado con anticuerpo primario ó secundario, para demostrar la especificidad de la inmunotinción. Los resultados obtenidos al realizar la inmunohistoquímica de GAD67 en las diferentes condiciones de hiperexcitación fueron los siguientes:

### **6.1. Grupo Control:**

Los resultados de ratas controles y las que fueron implantadas, pero no estimuladas, se expresan dentro de un mismo grupo, denominado control, debido a que al analizarlas no se observó ninguna diferencia. En este grupo (Figura 1) se observó inmunotinción en interneuronas inhibitorias y células en canasta en la base del giro dentado y sólo algunas células granulares presentaron inmunorreactividad para la GAD67 en estas condiciones (Figura 2). También se detectó inmunorreactividad, en las fibras musgosas. Como era de esperarse, no se observó inmunotinción en las células piramidales de la zona de CA1.

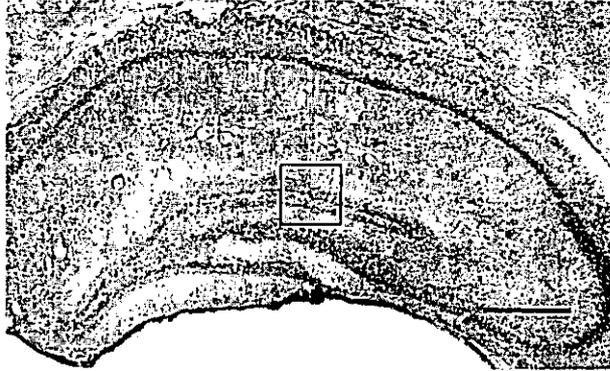


Figura 1. Corte coronal del hipocampo obtenido de una rata control donde se muestra la inmunotinción con GAD67. Nótese la marca de GAD67 en las interneuronas, tanto de la base como de CA3 y en las de la zona fibras musgosas y su ausencia en el giro dentado. Barra de calibración: 100 $\mu$ m.

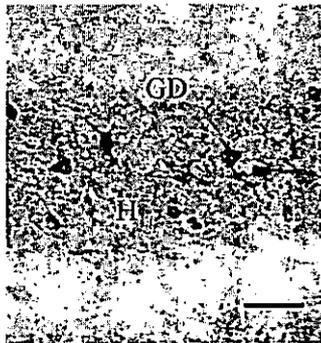


Figura 2. Fotomicrografía donde se muestra el giro dentado (GD) de una rata control e hilus (H). Unas pocas células granulares son inmunorreactivas para GAD67 en condiciones control. También se detectó tinción en algunas interneuronas de la base del giro dentado y del hilus. Equivalencia de la barra: 20 $\mu$ m.

## 6.2. Crisis única inducida por pentilenetrazol (PTZ).

Cuando se generó una sola crisis aguda por inyección de PTZ, no se incrementa la inmunoreactividad de GAD67 en el giro dentado, pero sí en las fibras musgosas (Figura 3). Además, las células en canasta que se localizan entre la base del giro dentado y la capa polimórfica se observan más densamente marcadas (Figura 4).

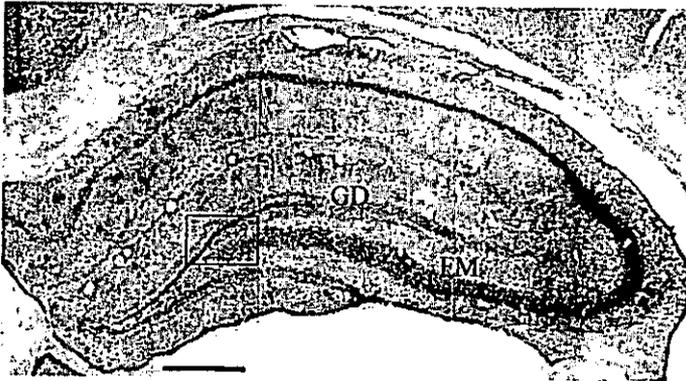


Figura 3. Fotomicrografía donde se muestra un corte coronal de hipocampo proveniente de una rata que presentó un sola crisis y que fue procesada 2 horas después de la crisis. La barra equivale a 100  $\mu\text{m}$ .



Figura 4. Esta fotografía es un acercamiento del giro dentado (GD) de la figura anterior, en la que se muestra un incremento de inmunotinción en las células en canasta y en las interneuronas del hilus (H). Sin embargo la falta de tinción del giro dentado es similar a las condiciones control. La barra equivale a 20 $\mu$ m.

### 6.3. Grupo epileptizado por el método de kindling y procesado 24 horas después

En los animales que fueron estimulados hasta generar 5 crisis convulsivas y que se procesaron un día después de la última crisis, se observó una marcada inmunorreactividad en el giro dentado y en las fibras musgosas figura 5. Los somas de las células granulares muestran una alta inmunorreactividad. figura 6.



Figura 5. Fotomicrografía donde se muestra un corte coronal de 30 $\mu$ m de grosor del hipocampo proveniente de una rata epileptizada por el método de kindling y que se procesó 24 horas después de la última crisis. En esta fotografía se muestra una densa inmunotinción tanto en las células granulares como en sus axones. La barra equivale a 100 $\mu$ m.

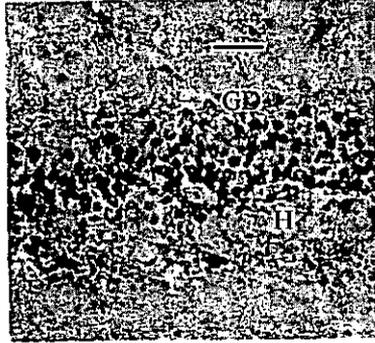


Figura 6. Fotografía, a mayor aumento del mismo tejido de la figura anterior, donde se muestra la capa granular con inmunorreactividad y algunas células marcadas en el hilus. La barra equivale a 20µm.

#### 6.4. Animales epileptizados por el método de kindling, y procesados 30 días después de la última crisis.

En los animales que se dejaron de estimular durante un mes, no se presentó un incremento en la expresión de la GAD67 en las células granulares del giro dentado. Sin embargo, algunas células granulares e interneuronas son inmunorreactivas. Por el contrario, las fibras musgosas conservan una alta inmunorreactividad (Figura 7). En la figura 8 se muestra un acercamiento del giro dentado y no se observa inmunotinción en los somas de las células granulares.

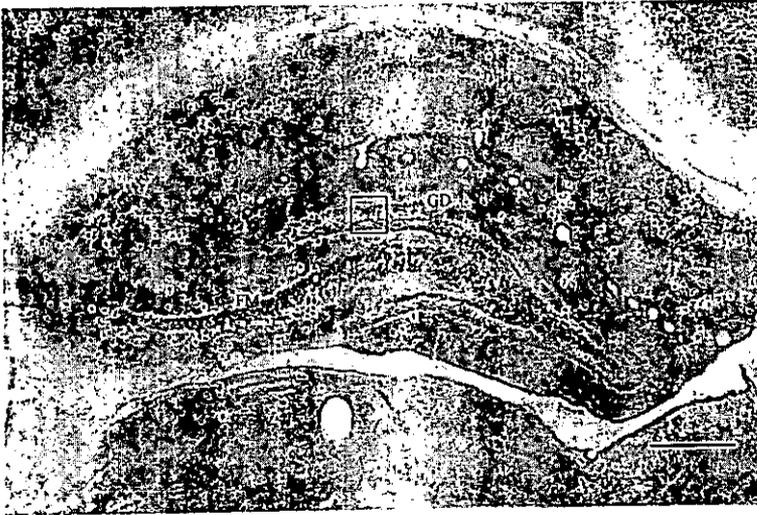


Figura 7. Fotomicrografía donde se muestra un corte de hipocampo de rata que se epileptizó por el método de kindling hasta generar 5 crisis convulsivas generalizadas y que no fue estimulada durante un mes. En estas condiciones se observó que las células granulares, al igual que en el grupo control, no presentan inmunorreactividad a GAD67. Por el contrario, las fibras musgosas están claramente marcadas. La barra equivale a 100  $\mu\text{m}$ .

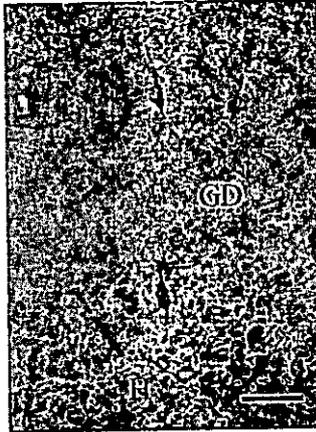


Figura 8. Acercamiento del giro dentado, un mes después de la última crisis. Nótese que no se observa marca de GAD67 excepto en algunas células granulares, e interneuronas. La barra equivale a 20  $\mu\text{m}$ .

### 6.5. Rebanadas de hipocampo estimuladas a alta frecuencia.

Rebanadas combinadas de corteza entorrinal-hipocampo provenientes de la misma rata y perfundidas en la misma cámara de registro fueron procesadas al mismo tiempo. Una de cada par fue estimulada y la otra se utilizó como control. Se observó que en las rebanadas estimuladas a alta frecuencia durante 3 horas, en las que se comprobó electrofisiológicamente la inducción de transmisión glutamatérgica y GABAérgica simultánea, se indujo la expresión de GAD67 en el giro dentado y en las fibras musgosas (Figura 9).



Figura 9 Fotomicrografía que muestra las diferencias de inmunorreactividad a GAD67 en el giro dentado en una rebanada control ( lado izquierdo) y otra que fue estimulada a alta frecuencia con un protocolo tipo LTP (lado derecho). Nótese la densa inmunorreactividad en el giro dentado de la rebanada que fue estimulada. La barra equivale 20  $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis concuerdan con los reportes previos que muestran la presencia de GAD en las células granulares de ratas normales (Sloviter y col., 1996; Lehmann y col., 1996). La presencia de esta enzima no había sido explicada y se pensaba que podía tener una función neurotrófica. Reportes posteriores mostraron que la síntesis de esta enzima se incrementaba después de crisis convulsivas provocadas por la estimulación eléctrica continua de la vía perforante y por inyección de ácido kaínico (Sloviter y col., 1996; Schwarzer y Sperk 1995; Lehmann y col., 1996). Estas evidencias permitieron sugerir que las células granulares eran capaces de sintetizar y, eventualmente, liberar GABA.

Esto no fue corroborado sino hasta que, por medio de técnicas electrofisiológicas, Gutiérrez (2000) y Gutiérrez y Heinemann, (2001) demostraron que las crisis convulsivas inducen liberación simultánea de GABA y glutamato en la sinapsis fibras musgosas-CA3. Esta liberación es transitoria, y es paralela a la síntesis transitoria de la GAD.

Si bien estos resultados se obtuvieron después de inducir un estado epiléptico, Gutiérrez (2000) demostró que una sola crisis era capaz de inducir la liberación simultánea de ambos aminoácidos. A partir de estos resultados, resultaba importante determinar si la causa de la sobreexpresión de GAD en esta sinapsis era debida a un proceso de epileptización o si la presencia de crisis convulsivas generalizadas aisladas es suficiente para inducir la sobreexpresión de la GAD.

Los resultados de este trabajo indican que el patrón regional de expresión de la GAD depende del tiempo que el sistema está sujeto a un estado de hiperexcitabilidad. Así, después de una crisis convulsiva generalizada no se incrementa la inmunoreactividad a esta enzima en el giro dentado, en los somas de las células granulares, pero sí en sus axones. Al parecer, una sola crisis no es capaz de producir un incremento de la enzima en los somas, pero sí de su mRNA, ya que previamente había sido descrito que una sola crisis provocada por ácido kaínico incrementa transitoriamente el mRNA

que codifica para la GAD67 en el giro dentado (Schwarzer y Sperk, 1995). Esto sugiere que el mRNA presente es traduccionalmente suprimido. Sin embargo, nosotros encontramos que después de una sola crisis sí se observa un incremento en la inmunoreactividad en las interneuronas conocidas como células en canasta que se localizan en la base del giro dentado, esto coincide con el aumento del mRNA para la GAD67 en estas células (Schwarzer y Sperk, 1995).

Por otro lado, la estimulación *in vitro* de la vía perforante durante 3 horas, que no genera actividad epiléptica, induce un incremento significativo de la expresión de la GAD en el giro dentado. Esta expresión coincide con la detección de transmisión GABAérgica y glutamatérgica simultánea (Gutiérrez, 2001 enviado a publicación). A diferencia de aquellos ensayos con PTZ, en los que se muestra una expresión de la GAD localizada en las terminales, en estos experimentos se observó incremento de la inmunoreactividad a la GAD tanto en giro dentado como en las fibras musgosas. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que la expresión diferencial de GAD67 en giro dentado y en fibras musgosas depende del tiempo en el cual el sistema es sometido a periodos de hiperexcitación, donde la presencia repetida de crisis convulsivas (kindling) o la estimulación *in vitro* por tres horas induce la presencia de GAD en el giro dentado, mientras que crisis aisladas lo hacen en las terminales.

El incremento transitorio en el giro dentado de las dos isoformas de la GAD por la estimulación de la vía perforante *in vivo* durante 24 horas ya había sido descrita (Sloviter y col., 1996). Por otro lado, el potencial inhibitorio producido en las células piramidales al estimular el giro dentado en presencia de bloqueadores de la transmisión glutamatérgica también es transitorio. Esto se demostró al estimular de la misma manera al giro dentado un mes después de la última crisis generada por el kindling. En estas condiciones, el potencial postsináptico inhibitorio ya no puede ser evocado. Esto coincide con la desaparición de la inmunoreactividad para GAD67 en la misma región.

Con estas evidencias podemos proponer que al presentarse un periodo de hiperexcitación en este sistema, surge la necesidad de utilizar las reservas de GAD existente, pero, si las condiciones de hiperexcitabilidad permanecen o se incrementan, se necesitará mayor cantidad de esta enzima por lo que el giro dentado comenzará a sintetizarla. Estos datos están de acuerdo con las evidencias que muestran la inducción de co-transmisión glutamatérgica y GABAérgica de las fibras musgosas en: a) animales que presentaron una sola crisis, y que no mostraron un incremento de esta enzima en el giro dentado, pero sí en las fibras musgosas; b) animales sometidos a hiperexcitación constante (kindling), que presentaron inmunorreactividad tanto en giro dentado como en fibras musgosas y c) preparaciones estimuladas por tres horas *in vitro*, que también muestran inmunorreactividad en giro dentado y en sus prolongaciones.

Una interrogante que tiene que explorarse aún es el hecho de que la aparición de co-transmisión de GABA y glutamato coincide con un incremento de la inmunorreactividad de GAD67 en las fibras musgosas cuando se sabe que la síntesis de GABA no es realizada exclusivamente por la GAD67. De hecho, es de esperarse que la isoforma que se incremente sea la GAD65 que se ha asociado con la síntesis de GABA en la sinapsis (Martin y Rimvall, 1993).

La presencia de las dos isoformas de la GAD (65, 67) y el GABA en condiciones normales en las células granulares (Sloviter y col., 1996; Sandler y Smith 1991), y los registros obtenidos por medio de la técnica de fijación de voltaje que han revelado una respuesta GABAérgica monosináptica en CA3 a la estimulación de las fibras musgosas (Walker y col., 2001) indican que el hecho de que no se observe la transmisión GABAérgica en las células piramidales después de bloquear la transmisión glutamatérgica, sugieren que el incremento de la GAD y, consecuentemente del GABA después del kindling, son condiciones necesarias para que la neurotransmisión inhibitoria sea evidente.

Los hallazgos presentados en este trabajo corroboran reportes previos que muestran que las células granulares del giro dentado son capaces de sintetizar GAD67 en respuesta a periodos de hiperexcitabilidad (Sloviter y col., 1996; Lehmann y col., 1996) y los extienden al determinar que el

patrón regional de esta síntesis depende de la actividad y finalmente, hemos correlacionado éstos con hallazgos electrofisiológicos. Estos últimos demuestran que la cotransmisión de GABA y glutamato se presenta al aumentar la síntesis de GAD. En un trabajo reciente de nuestro laboratorio (Gómez-Lira y col., 2001), hemos demostrado que este incremento de la síntesis de GAD va aunado al incremento de la concentración de GABA en las terminales de las fibras musgosas. Por último, recientemente se determinó que el mRNA que codifica para el transportador vesicular de GABA (VGAT) está presente en las células granulares y en sus axones y que su expresión es dependiente de la actividad del sistema (Lamas, y col., 2001). Estas evidencias, en conjunto, demuestran que las células granulares a pesar de ser glutamatérgicas, poseen la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis, vesiculación y liberación de GABA.

Nuestros hallazgos ponen en evidencia que la expresión de GAD67 en las células granulares se presenta en función del incremento de la excitación del sistema. A su vez, la presencia de transmisión glutamatérgica y GABAérgica simultánea de las fibras musgosas, después de la inducción de crisis convulsivas generalizadas o de potenciación de la transmisión sináptica, nos permiten proponer que la respuesta GABAérgica emerge posiblemente como un mecanismo compensatorio para prevenir la generación o generalización de la hiperexcitabilidad en el hipocampo evitando que sea transmitida a otras estructuras.

## REFERENCIAS

- Akbar M.T., Rattray M., Powell J.F. and Meldrum, B.S. 1996. Altered expression of group I metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of amygdale-kindled rats. *Mol. Brain. Res.* 43:105-116.
- Amaral D.G. 1978. A Golgi study of the cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 182: 815-914.
- Andersen P., Bliss T.P.V., Skrede K. 1971. Lamellar organization of the hippocampal excitatory pathways. *Exp. Brain. Res.* 13: 222-238.
- Asada H., Kawamura Y.; Maruyama K., Kume H.; Ding R., Yun Ji F., Kanbara N., Kuzume H., Sanbo M., Yagi T., and Obata, K. 1996. Mice lacking the 65kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD 65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochemical and biophysical research communications.* 229: 891-895.
- Babb T.L., Kupfer W.R., Pretorius J.K., Crandall P.H. and Levesque M.F. 1991. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic *fascia dentata*. *Neuroscience.* 42:351-3673.
- Bajorek J. G. Lee R J, Lomax P. 1986 .Neuropeptides: Anticonvulsant and convulsive mechanisms in epileptic model system and in humans. *Advances in Neurology* Raven Press. New York. 489-500.
- Balazs R., Machiyama Y., Hammond B.J., Julien T. and Richter D. 1970. The operation of  $\gamma$ -aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue *in vitro*. *Biochem. J.* 116:445-461.

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

Baxter, C.F. 1976. Some recent advances in studies of the GABA metabolism and compartamentation . In: *GABA in Nervous System Function*. Raven Press New York. pp 61-87.

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

Bu D-F., Erlander M.G., Hitz B.C., Tillakaratne N.J., Kuffman D.L., Wagner-McPherson C.B., Evans G.A. and Tobin A.J. 1992. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa y 67-kDa are each encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89.2115-2119.

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

Buszáki G., Horvath Z., Urioste R., Hetke J., and Wise K. 1992. High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science.* 256:1025-1027.

Caeser M. and Artesen A.D. 1991. Morphological organization of rat hippocampal slice cultures. *J. Comp. Neurol.* 307:87-106.

Cain D. P. and Corcoran M.E. 1981. Kindling in the seizure-prone and seizure-resistant mongolian gerbil. *Electroenceph. Clin. Neurophys.* 49:360-365.

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

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

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

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

Csiesvari J., Hirase H., Czurko A., Mamiya A. and Buzsaki, G. 1999. Oscillation coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving of the rat. *J. Neurosci.* 19: 274-287.

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

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

Ernfors P., Bengzon J. Kokaia Z., Persson H. and Lindvall O. 1991. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron.* 7:165-176.

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

Feldblum S. Erlander M.G. and Tobin A.J. 1993. Different distributions of GAD65 and GAD67 mRNAs suggest that the two Glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J. Neurosci.*

Research. 34: 689-706.

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

Freund T.F. and Buzsáki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 6:345-470.

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

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

Gómez-Lira G., Trillo, E., Ramírez M., Asai M., Sitges M. and Gutiérrez R. 2001 Expression of GABAergic transmission in the mossy fiber synapse coincides with the expression of GAD67 in granule cells and GABA in mossy fibers synaptosomes. Enviado a publicación.

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

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

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

Gutiérrez R. and Heinemann U. 1997 Simultaneous release of glutamate and GABA might be induced in mossy fibers after kindling. *Neurosci. Letters Suppl.* 48: S23.1997.

Gutiérrez R. 2000. Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic neurotransmission

in the dentate gyrus-CA3 system. *J. Neurophysiol.* 84: 3088-3090.

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

Gutiérrez R. 2000. Activity-dependent expression of GABAergic neurotransmission from mossy fibers in vitro. Enviado a publicación.

Halasy K., Buhl E.H., Lorinczi Z., Tamas G. and Somogyi I. 1996. Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus* 6:306-329.

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

Houser C.R., Harris A.B., and Vaughn J.E. 1986. Time course of the reduction of GABA terminals in a model of focal epilepsy: a glutamic acid decarboxylase immunocytochemical study. *Brain Res.* 238:413-420.

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

Isackson P.J. and Gall C.M.; 1989. Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science.* 247: 758-761.

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

epilepsy. *J. Neurosci.* 13: 1511-1522.

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

Johnston D. and Brown T.H. 1981. Giant Synaptic potential hypothesis for epileptiform activity. *Science*. 211:294-297.

Joy R. M. 1985. The effects of neurotoxicants on kindling and kindled seizures. *Fundamental and applied toxicology*. 5:41-65

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

Kalichman M.W. 1982. Neurochemical correlates of the kindling model of epilepsy. *Neurosci. Behav. Rev.* 6:165-181.

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

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

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

Kobayashi Y., Kaufman D.L. and Tobin A.J. 1987 Glutamic acid decarboxylase cDNA: nucleotide

sequence encoding an enzymatically active fusion protein. *J. Neurosci* 7: 2768-2772.

Kohler C., Eriksson J., Davies S. and Chan Palay, V. 1986. Neuropeptide Y innervation of the hippocampal region in the rat and monkey brain. *J. Comp. Neurol.* 244:384-400.

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

Lamas M., Gómez-Lira G., and Gutiérrez R. 2001. Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in the mossy fiber synaptosomes. *Mol. Brain Res.* 93:209-214.

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

Leech C.K. and McIntyre D.C. 1976. Kindling rates in inbred mice: Analog to learning? . *Behav. Biol.* 16: 439-452.

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

Lehmann, H. Ebert, Ulrich E, and Loscher W. 1996. Immunocytochemical localization of GABA immunoreactivity in dentate granule cells of normal and kindled rats. *Neurosci. Letters.* 212 41-44.

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

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

Martin D.L and Rimvall. K. 1993. Regulation of gamma- aminobutyric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.*

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

McGinty J.F., Kanamatsu T., Hong J.S., Morton J.D. and Frederickson C.J. 1988. Seizure-induced alterations of opioid peptide and a zinc metabolism in the hippocampus of rats. In: Nutritional modulation of neural function. Academic Press.

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

Mc Intyre D.C. 1986 Kindling mechanisms: current progress on an experimental epilepsy model. *Prog Neurobiol.* 27(1):1-12.

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

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

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

Miles R. and Wong, R.K.S. 1987. Latent synaptic pathways revealed after tetanic stimulation in the hippocampus. *Nature.* 329:724-726.

- Miles R., Toht K., Gulyas A.I., Hajos H. and Freund T.F. 1996. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*. 16: 815-823.
- Mody I. Reynolds J.N. Solter M.W. Carlson P.L. and Mac Donald J.F. 1990. Kindling induced epilepsy alters calcium currents in granule cells of the rat hippocampal slices. *Brain Res*. 531:88-94.
- Mody I. and Soltesz, I. 1993. Activity-dependent changes in structure and function of the hippocampal neurons. *Hippocampus*. 3:99-112
- Mody I. and Staley K.J. 1994. Cell properties in the epileptic hippocampus. *Hippocampus*, 4: 275-280.
- Morrel, F.TN. and Tsura, N. 1976. Kindling in the frog: Development of spontaneous epileptiform activity. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol*. 40:11-21.
- Mugnaini, E. and Oertel, W. H. 1985. An Atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 4. GABA and Neuropeptides in the CNS. Part 1. (A Björklund and T. Hökfelt. Eds). Elsevier Amsterdam. pp 436-608.
- Obenaus A., Esclapez, M. and Houser C. R. 1993. Loss of glutamate decarboxylase mRNA-containing neurons in the rat dentate gyrus following pilocarpine-induced seizures. *J. Neurosci*. 13(10): 4470-4485.
- O'keefe, J. Nadez, L. 1978. Anatomy. In: *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford University Press. Pp. 116-137.
- Olbrich H.G. and Braak H. 1985. Ratio of pyramidal cells *versus* non pyramidal cells in sector CA1

of the human Ammon's horn. *Anat. Embryol.* 173:105-110.

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

Pérez de la Mora M., Fuxe K., Hokfelt K. Andersson, L. Possani, L.D., Tapia, R. 1981 . GABAergic synapses: distribution and interactions with other neurotransmitter systems in the brain. En *Regulatory Mechanisms of synaptic transmission* (R. tapia y C.W. Cotman Eds. Plenum press, New York, pp 71-101

Przewlocki R., Kaminska B., Lukasiuk K., Nowicka D.Z., Przewlocka B., Kaczmarek, L. and Lason W. 1995. Seizure related changes in the regulation of opioid genes and transcription factors in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Neurosci.* 68:73-81.

Paxinos G. and Watson C. 1996. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Sydney: Academic Press.

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

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

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

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

Reimer J.R., Fon, E. A. and Edwards, R.H. 1998. Vesicular neurotransmitter and the presynaptic

regulation of quantal size. *Current opinion in neurobiology*.8: 405-412.

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

Rial R. V. and González J. 1978, Kindling effect in the reptilian brain: Motor and electrographic Manifestations. *Epilepsy*. 19:581-589.

Ribak C.E. and Seress L. 1983. Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J. Neurocytol.* 12:557 -597.

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

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

Roberts E. and Frankel S. 1950.  $\gamma$ -aminobutyric acid in brain: Its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 157:55-63.

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

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

- Sato K, Kashihara K., Morimoto K., and Hayabara T. 1996. Regional increases in brain derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA during amigdaloid kindling, but not in acidic and basic fibroblast growth factor mRNAs. *Epilepsia*. 37 1:6-14.
- Sandler R.D. and Smith A.D.1991. Coexistence GABA and glutamate in mossy fibers terminals of the primate hippocampus: a structural study. *J. Comp Neurol*. 303: 177-192.
- Schousboe A.1990. Neurochemical alterations associated with epilepsy or seizure activity. In *comprehensive Epileptology* (Dam M. and Gram L. eds.). Raven Press. New York. 1-16.
- Schmidt D. and Loscher W. 1981. GABA concentrations in cerebrospinal fluid and plasma of patients with epileptic seizures. In *neurotransmitters, seizures and epilepsy.*( P.L Morselli W. Loscher, K.G Lloyd, B. Meldrum and Reynolds I. eds). New York: Raven Press, pp 315-324.
- Schwarzer C. and Sperk. G. 1995 Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase-67 after limbic seizures in the rat. *Neuroscience*. 69: 705-709.
- Scoville W.B., Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampus lesions. *J. Neurol. Psychiatry*. 20: 11-21.
- Siegel G.J. Agranoff, W.B. Albers W. Molinoff, P.B.1989. *Basic Neurochemistry*. Raven Press New York.
- Sloviter R.S. 1987. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*. 235: 73-76.

Sloviter R.S., Ditcher, M.A., Rachinsky T.L., Dean E. Godman J.H; Sollas A.L. and Martin D.L.1996 Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J. Comparative Neurology* 373:593-6018

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

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

Steward O. 1976. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.* 167: 285-314.

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

Szábo G., Kartarova Z, Hoertnagl B, Somogyi R. and Sperk G. 2000. Differential regulation of adult and embryonic glutamate decarboxylases in rat dentate granule cells after kainate-induced limbic seizures. *Neuroscience* 100: 287-295.

Talavera E., Omaña-Zapata I., Asai M. and Condes-Lara M. 1989. Regional brain IR-Met, IR-Leu Enkephaline concentration during progress and full electrical amygdaloid kindling. *Brain. Res.* 485:141-148.

Tapia R. 1975. Biochemical pharmacology in CNS. In handbook of psychopharmacology, Vol 4.

(Iversen, L.L.; Iversen, S.D. and Snyder S.H. eds.). Plenumm. Press. New York. Pp 1-58.

Vindrola O., Briones R., Asai M. and Fernandez-Guardiola, A. 1981. Brain content of leu-5 and met-5 enkephalin changes independently during the development of kindling in the rat. *Neurosci. Letters*. 26:125-130.

Wada J.A and Osawa T.1978. Spontaneous recurrent seizure state induced by daily electric amygdaloid stimulation in senegalese baboons (*Papio papio*). *Neurology*.26:273-286.

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