



DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS  
COORDINADOR DEL POSGRADO  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de tesis realizado por la **Biol. Mayra Yanet Sánchez Ruiz**, con el título: "**LIBERACION DE ÁCIDO  $\gamma$ -AMINO BUTIRICO (GABA) EN CORTEZA CEREBRAL, CUERPO ESTRIADO E HIPOCAMPO DE RATAS TRATADAS NEONATALMENTE CON GLUTAMATO MONOSODICO (GMS) Y ANTAGONISTAS AMINOACIDOS EXCITATORIOS (MK-801)**", consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su disposición el escrito final para autorización de impresión y programación de fecha de examen de grado.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., a 21 de Abril de 1999.

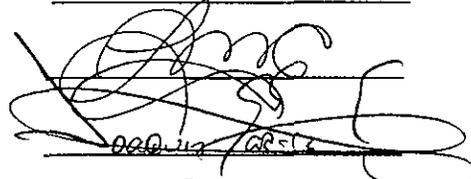
  
Dr. en C. CARLOS BEAS ZÁRATE  
DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. FERNANDO ALFARO BUSTAMENTE

M. EN C. LAURA MEDINA CEJA

DR. EN C. JOAQUIN GARCIA ESTRADA

M. EN C. ALMA ROSA DEL ANGEL MEZA


## DEDICATORIA

DEDICO EL PRESENTE TRABAJO A CUATRO PERSONAS A LAS QUE ADORO, PUES SON EL CIMIENTO EN EL QUE SE HA FORJADO MI VIDA Y EL REGALO MAS HERMOSO QUE DIOS ME BRINDO:

**A MI PAPI Y MAMI:** Con todo mi amor, como una manera muy sencilla de expresar lo mucho que los quiero, admiro y respeto. Como una pequeña muestra de que sus consejos, su apoyo y su ejemplo no han sido en vano. Gracias por guiar mi existencia, porque con su de amor me han hecho aceptar con ánimo las experiencias que me ha tocado vivir. Con este trabajo, les dejo parte de mis esfuerzos, mis sueños y mis logros.

**A MIS HERMANAS MAYELY Y WENDY:** A quienes nunca voy a dejar de admirar, mis mejores amigas y mis más fieles compañeras en todo momento. Gracias por su ternura, su apoyo y la ayuda que siempre me han brindado.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. en Cs. Carlos Beas Zárate, por la dirección y el apoyo que me brindó para la realización de esta tesis. Gracias por todas sus enseñanzas y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A la Maestra Alma Rosa del Angel Meza, por ser tan magnífica amiga, por brindarme consejos, entusiasmo y motivación en todo momento.

A Daniel, por su cariño, su apoyo incondicional y por todos los momentos que hemos compartido en estos años.

A mis compañeras y amigas Gris y Lety, porque dentro de su libertad, me eligieron para brindarme un sentimiento muy hermosos: su amistad.

A mis compañeros del laboratorio de Neuroquímica.

A Monica, por el apoyo y auxilio en la preparación de esta tesis.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE NEUROQUIMICA DE LA DIVISION DE NEUROCIENCIAS DEL CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE DEL IMSS, BAJO LA DIRECCION DEL DR. EN C. CARLOS BEAS ZARATE

# INDICE

PAGINA

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUCCION.....	2
1.1 El ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA).....	2
1.2 El Sistema GABAérgico en el cerebro.....	2
1.3 El metabolismo del GABA.....	3
FIGURA 1: "Sinapsis GABAérgica".....	6
1.4 Receptores a GABA.....	8
1.5 Importancia del Sistema GABAérgico.....	8
1.6 El Glutamato como neurotransmisor.....	10
FIGURA 2: "Sistema glutamatérgico".....	11
FIGURA 3: "Sinapsis glutamatérgica".....	14
1.7 Receptores a glutamato.....	16
FIGURA 4: "Receptores a glutamato".....	17
2. ANTECEDENTES.....	20

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
4. HIPOTESIS.....	27
5. OBJETIVOS.....	29
6. MATERIALES Y METODOS.....	31
6.1 Materiales.....	31
6.2 Animales de experimentación.....	31
6.3 Diseño experimental.....	31
7. Diagrama experimental.....	33
6.5 Experimentos de liberación de GABA-[ <sup>3</sup> H].....	34
A) Composición de medios para experimentos de liberación.....	35
6.6 ANALISIS ESTADISTICO.....	35
8. RESULTADOS.....	37
Gráfica 1 Liberación de GABA en corteza cerebral: 14 y 21 EP.....	39
Gráfica 2 Liberación de GABA en corteza cerebral: 30 y 60 EP.....	41
Gráfica 3 Liberación de GABA en cuerpo estriado: 14 y 21 EP.....	44
Gráfica 4 Liberación de GABA en cuerpo estriado: 30 y 60 EP.....	46
Gráfica 5 Liberación de GABA en hipocampo: 14 y 21 EP.....	50
Gráfica 6 Liberación de GABA en hipocampo: 30 y 60 EP.....	52

9. DISCUSION.....	55
10. CONCLUSIONES.....	63
11. BIBLIOGRAFIA.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	Alfa
$\text{Ca}^{2+}$	Calcio
CAT	Colina acetil transferasa
Ci	Curie
$\text{Cl}^-$	Cloro
$\text{CO}_2$	Bióxido de carbono
$^\circ\text{C}$	Grados centígrados
Da	Daltones
EP	Edad postnatal
FCE	Fluido cerebro espinal
g	Gramos
GABA	Acido $\gamma$ -aminobutírico
$\text{GABA-}^3\text{H}$	Acido $\gamma$ -aminobutírico tritiado
GABA-T	GABA transaminasa
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
$\text{K}^+$	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramo
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{mol}$	Micromol
M	Molar

mg	Miligramo
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
MK-801	Dizocilpina maleato
NaCl	Cloruro de Sodio
NR1	Subunidad NR1
NR2A	Subunidad NR2A
NR2B	Subunidad NR2B
NR2C	Subunidad NR2C
NR2D	Subunidad NR2D
PLP	Fosfato de piridoxal
R-AMPA	Receptor tipo AMPA
R-KA	Receptor tipo Kainato
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
R-NMDA	Receptor tipo N-metil-D-aspartato
R-No NMDA	Receptor tipo no N-metil-D-aspartato
sc	Subcutánea
SENaCl	Solución equimolar de cloruro de sodio

## RESUMEN

El glutamato se considera como el principal neurotransmisor excitador en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos. El interés por el estudio de este aminoácido se incrementó a partir de las observaciones del efecto neuroexcitatorio y neurotóxico que induce cuando se acumula en el espacio intersináptico de diversas regiones cerebrales. Con base en lo anterior, en los últimos 20 años, una de las herramientas utilizadas para tratar de delinear los mecanismos implicados en el daño y muerte celular (tal como se se observa en algunas enfermedades neurodegenerativas) es el empleo del Glu como una neurotoxina. Así, se ha observado que la administración sistémica (subcutánea o intraperitoneal) de Glu en su forma de sal monosódica a una dosis de 4 mg/gr de peso a ratas recién nacidas, induce lesiones a la retina y órganos circunventriculares, así como la disminución de ciertos parámetros de algunos neurotransmisores en diferentes áreas del SNC. Se ha propuesto en diversos estudios que el Glu induce daño excitotóxico y muerte neuronal a través de la activación excesiva de sus receptores, particularmente la sobreactivación del receptor tipo NMDA. Sin embargo, se ha demostrado que el daño celular inducido por el Glu puede reducirse substancialmente en diversos modelos *in vitro* e *in vivo* con el empleo del MK-801, antagonista no competitivo del receptor NMDA. En el presente trabajo se determinó la vulnerabilidad del sistema GABAérgico, en términos de liberación de GABA en varias regiones del SNC (corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo) durante el desarrollo postnatal de la rata previo tratamiento con GMS y MK-801 durante la primera semana de vida. Los resultados muestran que el GMS reduce significativamente la liberación basal y/o estimulada de GABA en las tres regiones que se estudiaron en la mayoría de las etapas del desarrollo (14,21,30 y 60 días postnatales), asimismo se observa que tal reducción se bloquea total o parcialmente con la co-administración de MK-801. Estos resultados indican en su conjunto que el tratamiento neonatal con GMS induce un efecto citotóxico sobre células GABAérgicas que está mediado en gran parte por los receptores NMDA, así como posiblemente por los receptores no-NMDA, a través de los cuales, se inducen modificaciones importantes en el patrón normal de desarrollo de la liberación de GABA en neuronas del SNC.

## ABSTRACT

Glutamate (Glu) is the major excitatory neurotransmitter in the mammals Central Nervous System (CNS). Interest had been increased over the last few decades to study the role of Glu in the CNS, especially its neuroexcitatory and neuroexcitotoxic effects when large quantities build up in the intersynaptic space of several brain regions. Accordingly, over the last 20 years, different neurotoxins have been widely used as tools to study the mechanisms involved in several neurodegenerative diseases, especially those related to excitatory aminoacids such as Glu. Thus, Glu given systemically (subcutaneously or intraperitoneally) as a monosodium salt, at a dose of 4 mg/ g body weight, to newborn rats causes lesions to the retina, organs circumventricular and decrease of certain markers of different neurotransmitters in several CNS areas. There are several studies showing the cytotoxic effect and neuronal death by excessive receptor activation, thus various Glu receptor subtypes have been involved, especially the NMDA type. On the other hand, MK-801 has been found to protect again Glu-related excitotoxic damage in a variety of *in vitro* and *in vivo* models. This work evaluated the susceptibility of the GABAergic system in terms of GABA release in various brain regions during the postnatal development of rats after being given MSG and MK-801 during the first week of life. Results showed that giving MSG to a rat induced a significant decrease in spontaneous and/or stimulated GABA release in the majority of developmental stages examined (14,21,30 and 60 postnatal days) in different regions of the CNS (cerebral cortex, striatum and hippocampus). Furthermore, it was observed that effect on the GABA release reduction were reversed by co-administration of MK-801 in a total or partial manner. These results suggest that giving MSG to a rat an early age induced a excitotoxic effect on GABAergic cells evidenced by change in GABA release. It also suggests that these GABA-mediated responses appear to be modulated by Glu receptors, mainly NMDA type, although the non-NMDA type should not be discarded.

# **INTRODUCCION**

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 EL ACIDO $\gamma$ -AMINO BUTIRICO (GABA)

Actualmente se reconoce que diversos aminoácidos actúan como neurotransmisores en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos, los cuales con base en estudios neurofisiológicos se clasifican en dos clases generales : los aminoácidos **excitadores** como el ácido glutámico (Glu) que despolarizan a las neuronas y, los aminoácidos **inhibidores** como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) que las hiperpolarizan (1).

El GABA se consideró por muchos años como un catabolito de los microbios y plantas. Sin embargo, en 1950 Roberts(2) y Awapara(3) de manera simultánea pero independientemente, identificaron al GABA como un constituyente normal del SNC de los mamíferos. El interés inicial por este aminoácido se debió al hecho de que, en el tejido nervioso de vertebrados se encuentra en altas concentraciones, mientras en otros órganos solo se han encontrado cantidades muy pequeñas. Obviamente se pensó que una substancia con tal distribución debía tener algunas características y efectos fisiológicos importantes para el funcionamiento del SNC (4)

### 1.2 EL SISTEMA GABAERGICO EN EL CEREBRO

El GABA parece ser el neurotransmisor más abundante en el SNC de los mamíferos. Se estima que de un 20% a un 50% de las sinapsis del SNC son GABAérgicas (5). Su concentración total en el cerebro es de aproximadamente 2  $\mu\text{mol/g}$  de tejido, por lo que resulta ser, al menos dos órdenes de magnitud, mayor que la de otros neurotransmisores como la acetilcolina o las catecolaminas. El GABA se considera como el principal neurotransmisor inhibitor del SNC en la etapa adulta se distribuye en regiones tales como la corteza cerebral (6), el estriado (7) y el hipocampo (8). En la década de los

cincuentas y sesentas se estudió la distribución del GABA en varias regiones del cerebro de diferentes especies tales como la rata (9,10), el gato (11), el mono (12,13), el humano (3) y posteriormente en 20 áreas del cerebro del mono *Rhesus* (14), encontrándose que los niveles más altos de GABA se localizan en la sustancia negra y en el globo pálido, seguido por el hipotálamo.

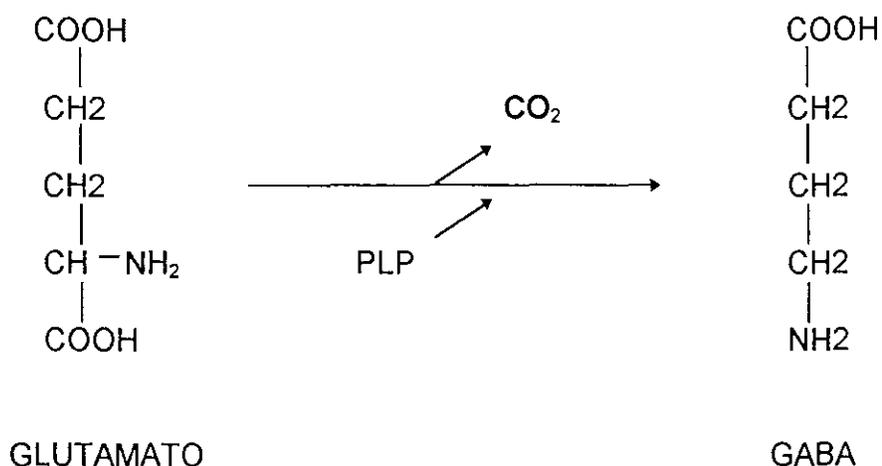
Por otro lado, se han descrito algunas vías probablemente GABAérgicas en el SNC de mamíferos (4) como lo son :

- Las células de Purkinje cerebelosas → núcleos profundos del cerebelo y núcleo de Deiters
- Las neuronas en canasta de la corteza cerebelosa → células de Purkinje
- Las células de Golgi de la corteza cerebelosa → células granulares del cerebelo
- Las neuronas en canasta del hipocampo → neuronas piramidales del hipocampo
- Las interneuronas del estriado
- Las neuronas del cuerpo estriado → sustancia negra
- Las neuronas del globo pálido → sustancia negra
- Las interneuronas corticales
- Las interneuronas retinales
- Las interneuronas del bulbo olfatorio
- Las interneuronas de la médula espinal

### 1.3 METABOLISMO DEL GABA

Para considerar una sustancia como neurotransmisor ésta debe producirse, almacenarse, liberarse y ejercer su efecto mediante receptores específicos, además de contar con mecanismos de eliminación de su sitio de

acción (15). El GABA se sintetiza a partir del ácido glutámico y la enzima responsable para su síntesis es la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; E.C.4.1.1.15), a diferencia de otras vías metabólicas que son multienzimáticas, esta enzima es el único paso limitante en la vía biosintética del GABA. La reacción catalizada por la GAD es la  $\alpha$  descarboxilación del ácido glutámico quedando directamente como productos el GABA y  $\text{CO}_2$  (4).



Se han descrito dos formas de GAD :  $\text{GAD}_{65}$  y  $\text{GAD}_{67}$ , tienen un peso molecular de 65,400 daltones (Da) y 66,600 Da respectivamente (16). Cada una de las isoformas de GAD es codificada por genes diferentes (17,18), ambas formas están presentes en el SNC y sintetizan GABA, además se conoce que están altamente conservadas entre los vertebrados y poseen más de un 95% de identidad en la secuencia de sus aminoácidos en gato, ratón, rata y humano (16,19). Sin embargo, en las mismas especies, las dos formas de GAD difieren en su secuencias de aminoácidos (sólo 65% de identidad en la rata), distribución intraneuronal y su interacción con el fosfato de piridoxal (20,21).

La degradación metabólica del GABA se lleva a cabo mediante la actividad de la enzima transaminasa del GABA (GABA-T; E.C.2.6.1.19). Esta enzima al igual que la GAD también se ha purificado del cerebro de varias

especies; su peso molecular es de 109,00 Da y parece estar constituida por dos subunidades no idénticas, una de 53,000 Da y la otra de 58,000 Da. Se localiza fundamentalmente en la mitocondrias y al igual que la GAD también requiere de fosfato de piridoxal como cofactor (4). Estudios pioneros de Waelesch en 1960 (4) mostraron la existencia de una compartimentalización del metabolismo del GABA, en donde se conoce que existe un pequeño depósito de Glu en la astrogliá y otro en las terminales nerviosas, que a su vez son el sitio de síntesis del GABA. El GABA que es captado por la astrogliá se transamina por la GABA-T para sintetizar Glu, que a su vez lo utiliza la enzima glutamina sintetasa para formar glutamina, la cual puede ser transportada a las terminales sinápticas en donde mediante la acción de la enzima glutaminasa se transforma nuevamente en Glu, principal precursor de la síntesis del GABA (4).

Por otro lado, en diversas preparaciones experimentales del SNC, tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha demostrado que el GABA se libera de las terminales sinápticas por estimulación de las fibras aferentes (4) o por despolarización con una alta concentración de  $K^+$  en el medio (22), esta liberación depende de la presencia de  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que el GABA puede ser liberado de terminales sinápticas mediante dos mecanismos: uno que es independiente de  $Ca^{2+}$  y otro que es dependiente de  $Ca^{2+}$  donde se presenta la exocitosis de vesículas sinápticas (23,24). En el caso de la liberación de GABA dependiente de  $Ca^{2+}$ , los iones  $Ca^{2+}$  entran a la terminal a favor de su gradiente de concentración, lo que facilita la unión de las vesículas con la membrana de la terminal sináptica, activándose los mecanismos responsables de la liberación del GABA al espacio intersináptico (25).

El mecanismo de eliminación del GABA del espacio intersináptico consiste en la recaptura del transmisor hacia la propia terminal sináptica, a través de un proceso de alta afinidad ( $K_m$  del orden de 10-40  $\mu M$ ) que requiere de  $Na^+$  y  $Cl^-$  y otro de baja afinidad, en el que participan las células gliales ( $K_m$  aproximada de 300  $\mu M$ ) (4).

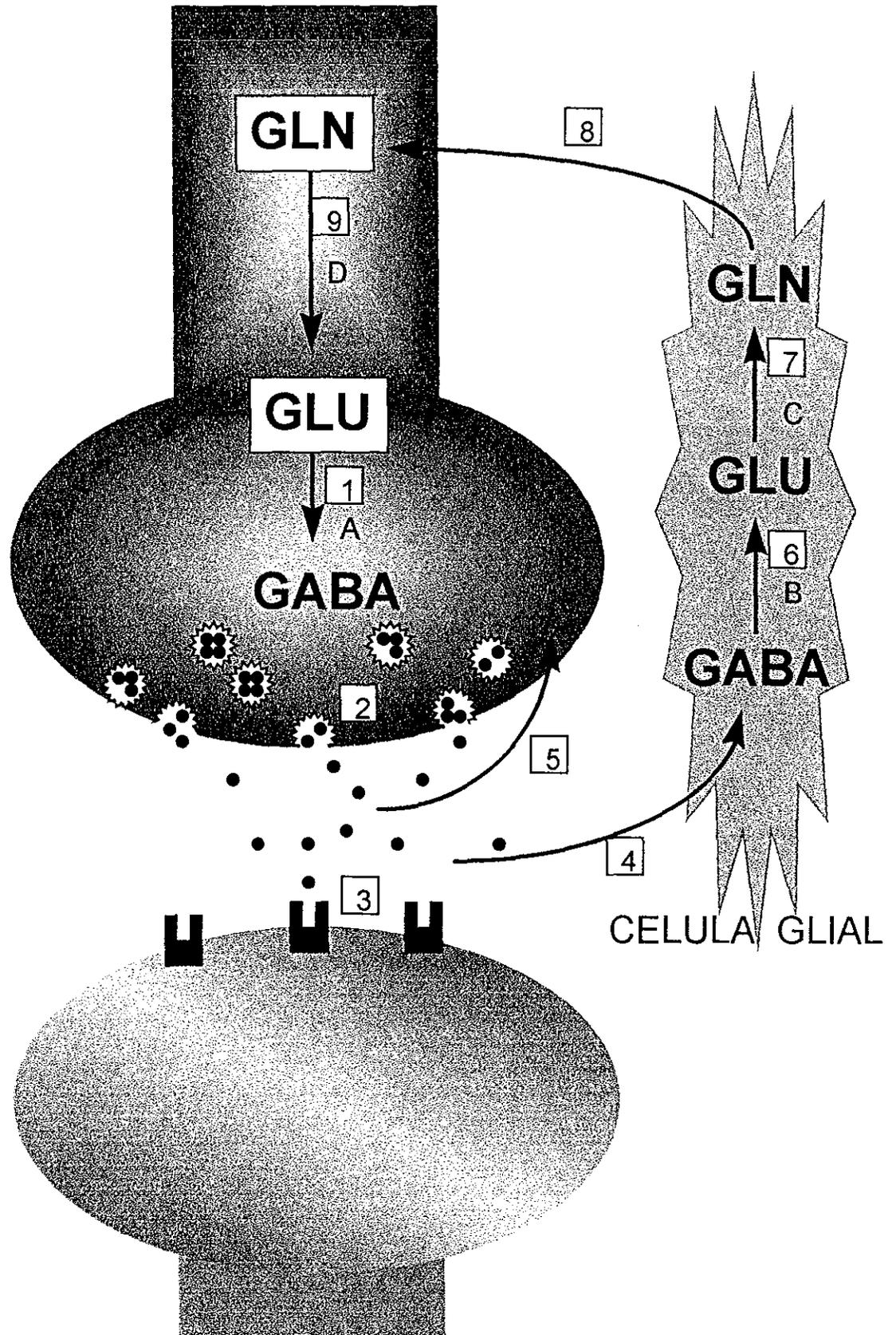
**FIGURA 1****“SINAPSIS GABAérgica”**

Diagrama esquemático de la neurotransmisión GABAérgica

ENZIMAS : (A) Descarboxilasa del Acido Glutámico (GAD)  
(B) Transaminasa del ácido glutámico (GABA-T)  
(C) Glutamina sintetasa  
(D) Glutaminasa

- 1.- Síntesis de GABA
- 2.- Liberación de GABA dependiente de  $Ca^{2+}$
- 3.- Interacción con el receptor de la membrana postsináptica
- 4.- Captura de GABA por las células gliales
- 5.- Captura de GABA por la terminal presináptica
- 6.- Conversión de GABA a glutamato
- 7.- Conversión de glutamato a glutamina
- 8.- Liberación y captura de glutamina
- 9.- Síntesis de glutamato

# NEURONA PRESINAPTICA



# NEURONA POSTSINAPTICA

## 1.4 RECEPTORES A GABA

El GABA ejerce sus acciones fisiológicas a través de distintas clases de receptores que pueden diferenciarse en base a su selectividad para agonistas y antagonistas específicos.

El receptor **GABA<sub>A</sub>** (R-GABA<sub>A</sub>) se considera como el más abundante en el cerebro (26), este tipo de receptores parecen localizarse postsinápticamente (27), su estimulación produce un incremento en la conductancia al Cl<sup>-</sup>, lo que produce una inhibición de la actividad neuronal debido a una hiperpolarización, además presenta sitios de unión a benzodiazepinas, barbituratos, esteroides y convulsionantes que pueden regular su actividad (28,29). Los receptores **GABA<sub>B</sub>** (R-GABA<sub>B</sub>) se localizan tanto pre como postsinápticamente (30,31), estos receptores están involucrados en la inhibición de la conductancia del Ca<sup>2+</sup> en diversos tipos de neuronas (32,33), así como en la inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores, por ejemplo; en el hipocampo regula la inhibición tanto de la transmisión GABAérgica (34,35) como la glutamatérgica (36,37). Por otro lado, diversos estudios sugieren la existencia de receptores a GABA que difieren farmacológicamente a los GABA<sub>A</sub> y los GABA<sub>B</sub>, los cuales se han denominado como **GABA<sub>C</sub>** (R-GABA<sub>C</sub>), este subtipo de receptor al igual que el GABA<sub>A</sub> posee un canal iónico permeable a Cl<sup>-</sup> (38,39).

## 1.5 IMPORTANCIA DEL SISTEMA GABAérgico

Desde hace varios años se conoce que el GABA no solamente es el neurotransmisor inhibitorio más abundante en el SNC, sino que también está ampliamente distribuido fuera de él, ya que se ha detectado en más de 20 tejidos periféricos tales como los ovarios, los islotes pancreáticos y los riñones (40). Se ha reportado que el muscimol (agonista del R-GABA<sub>A</sub>) inhibe la motilidad intestinal *in vivo* cuando se administra sistémicamente, mientras que

el baclofén (agonista del R-GABA<sub>B</sub>) estimula la motilidad duodenal (41). Al GABA también se le ha implicado en la ingesta, ya que se ha observado que los R-GABA<sub>A</sub> inhiben la actividad metabólica en el tejido adiposo, lo que conduce a una reducción en el consumo de alimento (42). Se conoce además que el GABA se involucra en forma importante en la regulación de una serie de funciones generales como son: la actividad motora y la secreción de ciertas hormonas hipofisarias.

En algunos estudios se ha visto que la administración sistémica de agentes GABAérgicos induce hipomotilidad o sedación (43,44), asimismo hay evidencias que muestran que el GABA incrementa la secreción ovárica de estradiol y reduce la de progesterona (45).

Por otro lado, se considera que el GABA juega un papel importante en los procesos de aprendizaje y de memoria ya que hay estudios que muestran que el sistema GABAérgico de la amígdala está involucrado en la modulación del almacenamiento de la memoria (46,47). También los agonistas a GABA se conoce que son potentes analgésicos (48).

El GABA parece estar implicado en alteraciones neurológicas y mentales; se considera que una disminución en la función de las sinapsis GABAérgicas es uno de los principales factores en la epileptogénesis (49). Por otro lado, estudios efectuados en fluido cerebro-espinal (FCE) de esquizofrénicos muestran una disminución significativa en los niveles de GABA (50), lo que proporciona evidencias experimentales que sugieren la importancia de este aminoácido en esta patofisiología.

Asimismo, se midieron los niveles de GABA en FCE de pacientes con estados depresivos, encontrándose reducción en los niveles de GABA (51). Además, se ha reportado una reducción en los niveles de GABA en la corea de Huntington (52), así como una disminución en la unión de GABA en la enfermedad de Alzheimer (53).

Por otro lado, se han realizado estudios en los que se ha reportado que en etapas tempranas del desarrollo, antes del establecimiento de la inhibición sináptica, existe una maduración temprana del mecanismo que implica la liberación de GABA, hecho que soporta la idea de que el GABA posee un papel trófico importante ya que actúa en procesos como la proliferación, migración y diferenciación celular durante el desarrollo del SNC (54).

Sin lugar a dudas, el GABA es una molécula de gran importancia en la neurobiología. No solamente es uno de los neurotransmisores más ampliamente distribuido en el SNC de mamíferos, sino que además su acción de tipo inhibitoria parece desempeñar un papel importante en la regulación de diversos procesos neuronales.

## **1.6 EL GLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISOR**

El ácido glutámico es un aminoácido que se considera como el principal neurotransmisor de tipo excitador en el SNC de los mamíferos (55). La primera demostración de que los aminoácidos ácidos como el Glu participan en la excitación del cerebro fue proporcionada por Hayashi, con experimentos en los que se aplicó glutamato monosódico (GMS) tópicamente en la corteza motora de perros y simios, hecho que produjo la aparición de convulsiones severas (56,57). Actualmente el Glu satisface los principales criterios para considerarlo como un neurotransmisor.

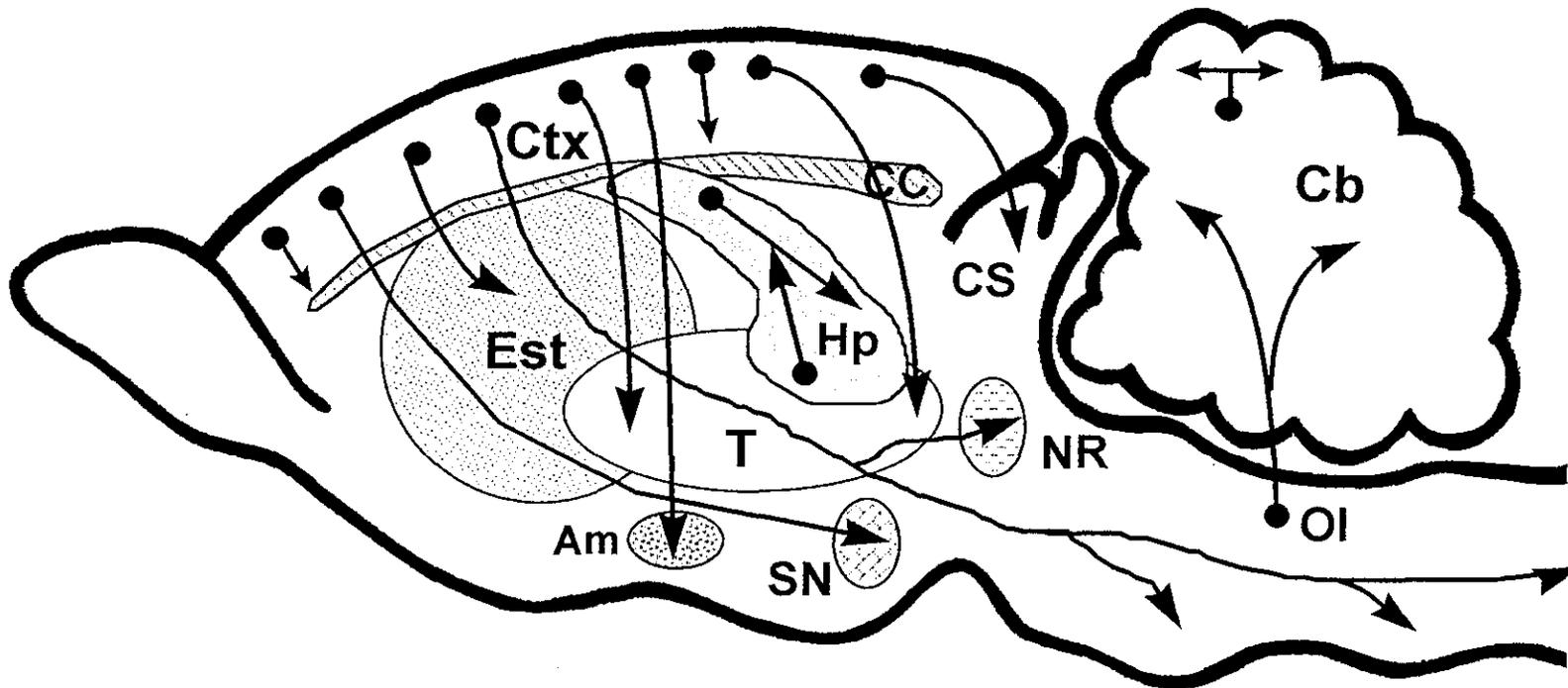
La distribución del Glu es ubicua en el SNC y ocupa una posición central en el metabolismo del cerebro, en donde es precursor del GABA.

En el SNC de mamíferos el Glu se localiza principalmente en las interneuronas corticales (58,59), en las aferencias corticales hacia el cuerpo estriado (60,61), en la capa molecular del giro dentado, en las fibras musgosas del hipocampo (62,63), en las vías cerebelares y en la médula espinal (26,64).

**FIGURA 2****“SISTEMA GLUTAMATERGICO”**

Diagrama esquemático de las principales vías glutamatérgicas en el SNC de la rata

<b>Am</b>	Amígdala
<b>Cb</b>	Cerebelo
<b>Cs</b>	Colículo superior
<b>Ctx</b>	Corteza cerebral
<b>Est</b>	Estriado
<b>Hp</b>	Hipocampo
<b>NR</b>	Núcleo rojo
<b>OI</b>	Oliva inferior
<b>SN</b>	Sustancia negra
<b>T</b>	Tálamo



**Am:** amígdala; **Cb:** cerebelo; **CS:** colículo superior; **Ctx:** corteza cerebral;  
**Est:** estriado; **Hp:** hipocampo; **NR:** núcleo rojo; **Ol:** oliva inferior;  
**SN:** sustancia negra; y **T:** tálamo

El Glu se sintetiza a partir de la glutamina (Gln), el  $\alpha$ -cetoglutarato o la ornitina, siendo la Gln el principal precursor metabólico para la síntesis de Glu y GABA (65,66). En las células nerviosas el Glu se almacena en la terminal presináptica dentro de vesículas y se libera en forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el espacio intersináptico, en donde puede actuar sobre sus receptores postsinápticos y presinápticos y, ser capturado por la célula presináptica o por los astrocitos (67).

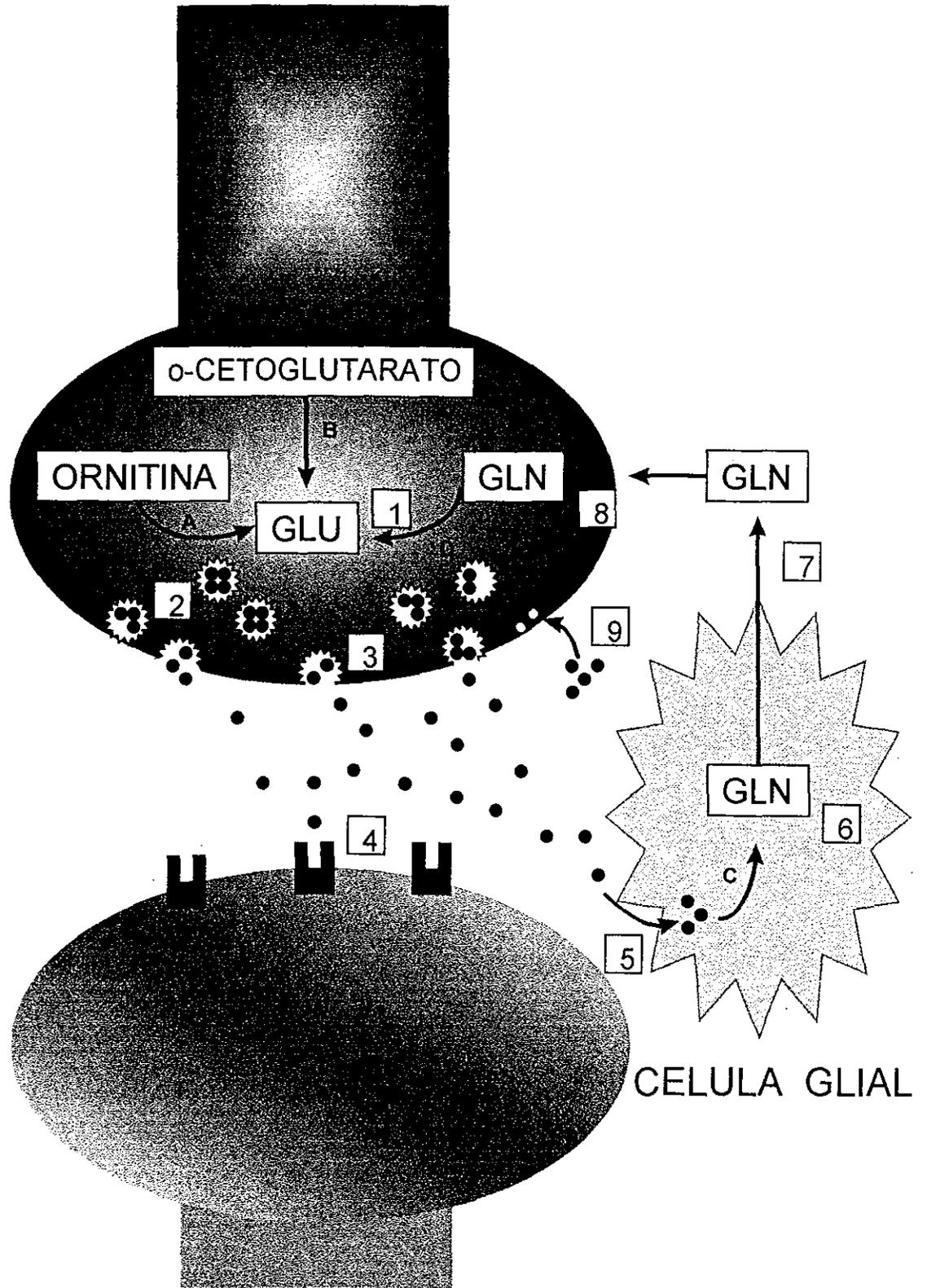
**FIGURA 3****“SINAPSIS GLUTAMATERGICA”**

Diagrama esquemático de la neurotransmisión glutamatérgica

Enzimas: A) Ornitin amino transferasa  
B) Deshidrogenasa del ácido glutámico  
C) Glutamina sintetasa  
D) Glutaminasa

- 1) Síntesis de glutamato (Glu)
- 2) Captura de Glu en vesículas intracelulares
- 3) Liberación de Glu
- 4) Interacción de Glu con receptores postsinápticos
- 5) Captura de Glu en células gliales
- 6) Conversión a glutamina (Gln)
- 7) Liberación de Gln a partir de células gliales
- 8) Captura de Gln por la células gliales
- 9) Captura de Glu por la termina presináptica

# NEURONA PRESINAPTICA



# NEURONA POSTSINAPTICA

## 1.7 RECEPTORES A GLUTAMATO

El Glu interactúa con receptores específicos, los cuales se han clasificado por la manera en que operan en: **ionotrópicos** (a través de la apertura de canales iónicos acoplados al receptor y que son permeables a diferentes cationes) y **metabotrópicos** (68).

Los receptores ionotrópicos se han subdividido por su afinidad a diferentes agonistas específicos en: **N-metil-D-aspartato (NMDA)**, **ácido 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA)**(kainato de baja afinidad) y **Kainato (KA)**(kainato de alta afinidad) (69,70). Estos receptores poseen propiedades fisiológicas únicas, así como una diferente distribución y desarrollo. Cada receptor está formado por 5 subunidades polipeptídicas que van a formar el canal a través del cual se da el flujo de iones, la múltiple posibilidad de combinaciones genera receptores homoméricos o heteroméricos (71), así como diferentes propiedades funcionales.

Los receptores tipo NMDA (R-NMDA) están conformados por diferentes subunidades que se han denominado como NR1 y NR2A-D, se caracterizan por su dependencia de voltaje, su permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  y sus múltiples sitios fármaco-regulatorios, como son los sitios de unión para: glicina, fenciclidina, dizocilpina,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y poliaminas tales como la espermina y la espermidina, así como un sitio sensible a los cambios de óxido-reducción (72). Los receptores no-NMDA (AMPA y Kainato) son permeables principalmente a  $\text{Na}^{2+}$  y  $\text{K}^{2+}$ , son los responsables de la transmisión sináptica rápida. Los receptores tipo AMPA están compuestos por subunidades denominadas GluR1-R4, mientras que los receptores del tipo KA están constituidos por las subunidades GluR5-7, así como KA1 y KA2 (73).

**FIGURA 4**  
**“RECEPTORES A GLUTAMATO”**

Diagrama esquemático de los receptores tipo ionotrópico del glutamato

**RECEPTOR NMDA**

NR1A-H: subunidades

SITIOS DE UNION DEL RECEPTOR: - NMDA

-GLU

-REDOX

-PA (poliaminas)

-GLI (Glicina)

-Zn<sup>2+</sup>

-MK-801 y PCP

-Mg<sup>2+</sup>

**RECEPTOR AMPA/KA**

GluR5-7 y KA1-2: subunidades

SITIOS DE UNION DEL RECEPTOR: -AMPA

-AK

-GLU

- BENZODIAZEPINAS

**RECEPTOR KA**

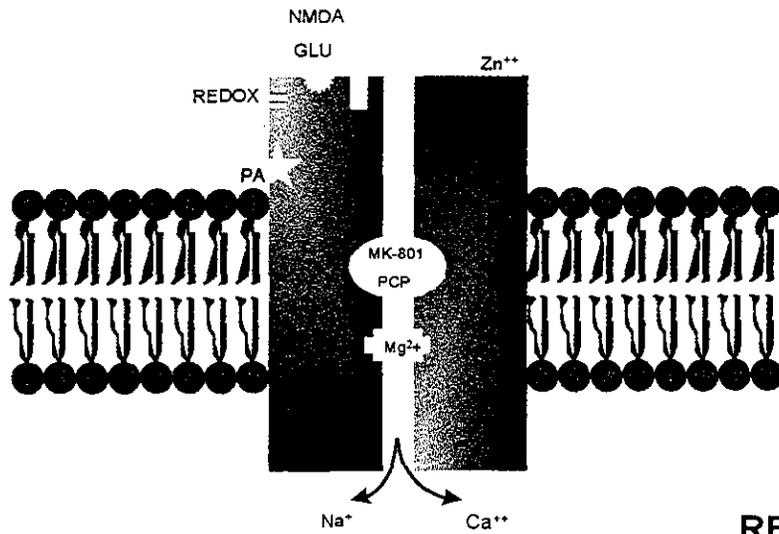
GluR1-4: subunidades

SITIOS DE UNION DEL RECEPTOR: -AK

-GLU

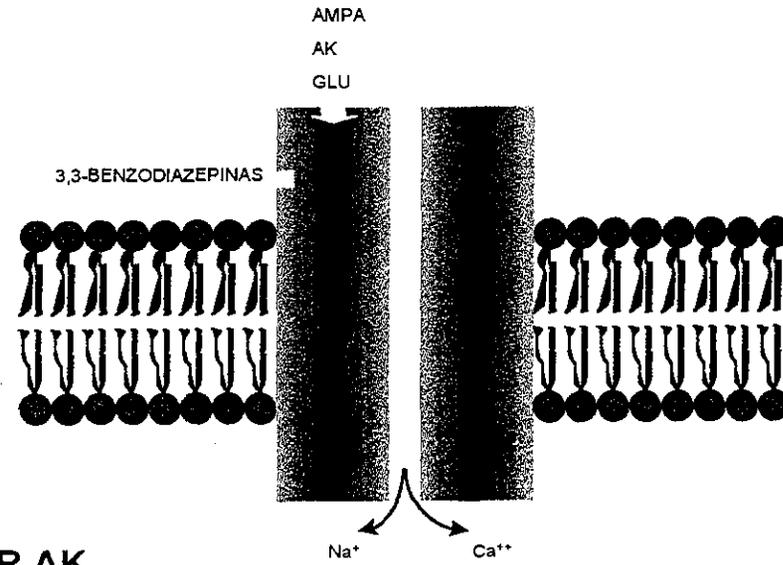
## RECEPTOR NMDA

NR1A-H Y NR2A-D



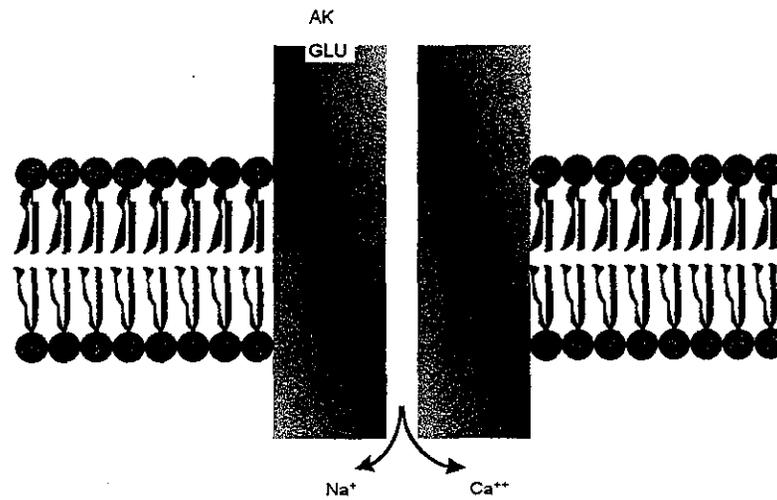
## RECEPTOR AMPA/AK

GluR1-4



## RECEPTOR AK

GluR5-7 y KA1-2



# **ANTECEDENTES**

## 2. ANTECEDENTES

Durante años, numerosas investigaciones se han enfocado al estudio de aspectos relacionados con el Glu y el SNC (74,75). Parte de estos estudios se relacionan con los diferentes subtipos de receptores a Glu, ya que al parecer juegan un papel importante en la fisiología y patofisiología del SNC durante su desarrollo (76).

Hallazgos obtenidos en diversos trabajos sugieren que los receptores a Glu están involucrados en procesos fisiológicos importantes durante el desarrollo del SNC, como la sinaptogénesis. En este sentido, se le ha dado relevancia al R-NMDA, ya que la activación de éste receptor es un factor determinante en períodos críticos del desarrollo postnatal debido a su influencia de tipo neurotrófica relacionada con el brote, la migración y la sobrevivencia neuronal (77), así como la reorganización y remodelación sináptica de las primeras semanas de edad postnatal (78,79). Al respecto, existen estudios en los que se ha demostrado que el bloqueo de R-NMDA con antagonistas específicos, inhibe la migración celular, mientras que por el contrario, la estimulación del receptor incrementa el movimiento celular (80).

Por otro lado, el interés en el estudio del Glu, después de su establecimiento como neurotransmisor, se incrementó con el descubrimiento de su efecto tóxico en tejido nervioso (67). Los primeros estudios en cuanto a su toxicidad datan de 1957, cuando Lucas y Newhouse al estudiar el posible efecto terapéutico de este aminoácido en una forma de degeneración retinal hereditaria en ratas neonatales, encontraron que contrario a lo que se esperaba, el Glu provocó una degeneración aguda irreversible en las neuronas de las capas internas de la retina (81). Estudios posteriores revelaron que no solo la retina, sino también el núcleo arcuato del hipotálamo y otras áreas circunventriculares, eran particularmente vulnerables a los efectos tóxicos del Glu cuando se administra sistémicamente en roedores neonatales (82).

Posteriormente Olney y col. relacionaron la activación de los receptores a aminoácidos excitadores como el Glu con la toxicidad, hecho que condujo al concepto general de excitotoxicidad (83).

Así, en base a trabajos en los que se analizó la correlación entre las propiedades excitadoras del Glu y la habilidad que posee para causar daño neurotóxico, se propuso que la activación excesiva de sus receptores puede iniciar una cascada de eventos químicos intracelulares que conducen al daño celular y llevan hasta la muerte celular (84). La sobreactivación de estos receptores se ha implicado en algunos desórdenes neurológicos como: isquemia cerebral, hipoglicemia, traumatismos y la epilepsia, así como en las enfermedades crónicas neurodegenerativas, entre las que se incluyen el complejo demencia-SIDA, esclerosis amiotrófica lateral, el mal de Parkinson, la enfermedad de Huntington y Alzheimer (85,86) y otras enfermedades que se caracterizan por presentar daño y disminución selectiva de neuronas colinérgicas y GABAérgicas.

Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal (87) y las neuronas piramidales del hipocampo (88) son vulnerables al daño, mientras que en la enfermedad de Huntington se ha encontrado un agotamiento selectivo del GABA y la GAD; así como de la acetilcolina y la CAT. Sin embargo, se requieren de más trabajos para tratar de esclarecer los mecanismos que participan en el daño celular y la vulnerabilidad durante el desarrollo del SNC que presentan los diferentes sistemas de neurotransmisión.

Una de las herramientas que más se han empleado para tratar de dilucidar los mecanismos que inducen el daño neuronal ha sido el uso de neurotoxinas, como la administración del ácido glutámico en forma de sal monosódica (GMS) por vía sistémica (subcutánea o intraperitoneal) a una dosis de 4 mg/g de peso corporal en ratas recién nacidas (89), esta dosis induce daño celular en diferentes regiones del cerebro. En estudios previos que se

realizaron en nuestro laboratorio, se empleó éste modelo para analizar la influencia del GMS sobre el desarrollo del sistema colinérgico de la rata, encontrándose una reducción en la actividad de la CAT (90), hecho que muestra que éste sistema es susceptible al efecto tóxico del Glu. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que estas neuronas no son el único blanco del daño celular, por lo que se propuso que el sistema GABAérgico también podría ser susceptible al efecto del Glu, ya que tanto las células colinérgicas como GABAérgicas han mostrado ser vulnerables en las enfermedades neurodegenerativas. Posteriormente se encontró que el Glu induce una marcada reducción en la liberación de GABA (91), lo que sugiere la vulnerabilidad de éste sistema.

Para tratar de delinear los mecanismos de excitotoxicidad inducida por el Glu, se dió un gran avance con la observación de Choi (92) de que la toxicidad del Glu es dependiente de  $Ca^{2+}$ , hecho por el que se considera que el R-NMDA es el subtipo de receptor que principalmente se implica en el daño y degeneración neuronal (68), ya que su activación permite el influjo de  $Ca^{2+}$  a las neuronas. Sin embargo, aunque la sobreactivación de los tres subtipos de receptores a Glu (NMDA,AMPA y Kainato) pueden inducir alteraciones neurodegenerativas (93), el descubrimiento de que los antagonistas del R-NMDA son neuroprotectores en los modelos animales de isquemia e hipoglicemia (94,95), sugirió la posible participación del R-NMDA en los eventos celulares que se presentan en enfermedades neurodegenerativas (96).

El MK-801(dizocilpina), es un antagonista no competitivo del R-NMDA que actúa mediante el bloqueo del canal iónico, por lo que se inhibe el influjo de  $Ca^{2+}$ (97), considerado como un factor fundamental para la inducción del daño celular. Se ha establecido que la dizocilpina protege del daño excitotóxico en diversos modelos tanto *in vivo* como *in vitro*. Así; en estudios realizados en cultivos de células ganglionares de la retina, se observó una marcada reducción en el daño celular después de haberse expuesto a Glu (98), asimismo, en estudios realizados en la retina de embrión de pollo, se ha

establecido que la dizocilpina es el componente protector más potente después del daño inducido por el NMDA (99), éste mismo efecto se observó en cultivos primarios de corteza de ratón (100) y en cultivos de hipocampo después de la exposición al NMDA (101). La dizocilpina aplicada sistémicamente también protege de la degeneración neuronal en el cerebro de la rata después de la inyección intracerebral del NMDA y agonistas relacionados (102). Se ha demostrado que la dizocilpina protege del daño celular en diversos modelos animales de isquemia.

Así, con base a lo anteriormente descrito, el presente trabajo se diseñó para determinar el efecto que tiene la administración neonatal de GMS y MK-801 en la rata (durante la primera semana de vida) sobre la neurotransmisión GABAérgica en regiones del SNC con inervación glutamatérgica durante el desarrollo postnatal de la rata. Esto nos permitirá profundizar en los mecanismos involucrados en la vulnerabilidad y el daño celular inducido por Glu sobre las células del SNC.

**PLANTEAMIENTO  
DEL  
PROBLEMA**

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Glu es el principal neurotransmisor excitador en el SNC de los mamíferos. Diversos estudios muestran que la administración neonatal de Glu en su forma de sal monosódica (GMS) induce degeneración neuronal en regiones cerebrales con inervación glutamatérgica como son: la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo; regiones susceptibles en diversos padecimientos neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer, Huntington, y Parkinson, en las que se ha visto que se afectan diversos sistemas de neurotransmisión. Se ha propuesto que el efecto neurocitotóxico que ejerce el Glu está mediado a través de la sobreactivación de los diferentes subtipos de receptores a Glu, particularmente los de tipo NMDA. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio muestran que el sistema GABAérgico es un blanco importante del daño celular ya que el Glu induce una importante modificación en la liberación de GABA. Con base a lo anterior, en el presente trabajo se pretende analizar los efectos resultantes de la administración neonatal de Glu, y el bloqueo de los receptores tipo NMDA, en regiones del SNC con inervación glutamatérgica, durante el desarrollo postnatal de la rata, lo que permitirá precisar algunos de los mecanismos sobre la toxicidad del Glu en las células GABAérgicas.

# **HIPOTESIS**

#### 4. HIPOTESIS

Si la administración neonatal de GMS reduce la liberación de GABA durante el desarrollo por sobreestimulación de los receptores a Glu en etapas tempranas, luego entonces el tratamiento con algún antagonista a receptores a Glu, permitirá eliminar este efecto.

# **OBJETIVOS**

## 5. OBJETIVOS

### GENERAL :

Analizar la liberación de GABA en diferentes regiones del cerebro de ratas tratadas neonatalmente con GMS y en presencia de MK-801.

### PARTICULARES :

- 1) Determinar la liberación de GABA en rebanadas de tejido de la corteza frontal, el estriado y el hipocampo a diferentes edades (14,21,30 y 60 días) en ratas tratadas neonatalmente con GMS.
- 2) Determinar la liberación de GABA en rebanadas de tejido de la corteza frontal, el estriado y el hipocampo a diferentes edades (14,21,30 y 60 días) en ratas tratadas neonatalmente con MK-801.
- 3) Determinar la liberación de GABA en rebanadas de tejido de la corteza frontal, el estriado y el hipocampo a diferentes edades (14,21,30 y 60 días) en ratas tratadas neonatalmente con GMS y MK-801.

**MATERIAL**

**Y**

**METODOS**

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 MATERIALES

El glutamato monosódico (GMS), el ácido aminooxiacético (AOAA) y el MK-801 se adquirieron de Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA . El resto de los reactivos se obtuvieron de la máxima calidad disponible en el mercado.

El ácido gamma-[2,3-<sup>3</sup>H(N)] -aminobutírico ([<sup>3</sup>H]-GABA; act.esp.36.8 Ci/mol) se adquirió de New England Nuclear, Du PontCo., Wilmington, USA.

### 6.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se emplearon ratas preñadas de la cepa *Wistar* que se mantuvieron en jaulas por separado bajo condiciones de bioterio, esto es; con acceso libre al agua y al alimento, con períodos de luz y oscuridad con ciclos de 12 x 12 hrs, temperatura óptima (23 y 25 °C) y en jaulas por separado. El día del nacimiento todas las camadas se ajustaron a 8 crías por hembra y se procedió al tratamiento y formación de grupos. Para la realización de los experimentos se emplearon ratas macho. Todos los animales que conformaron los diferentes grupos eran de camadas en paralelo.

### 6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

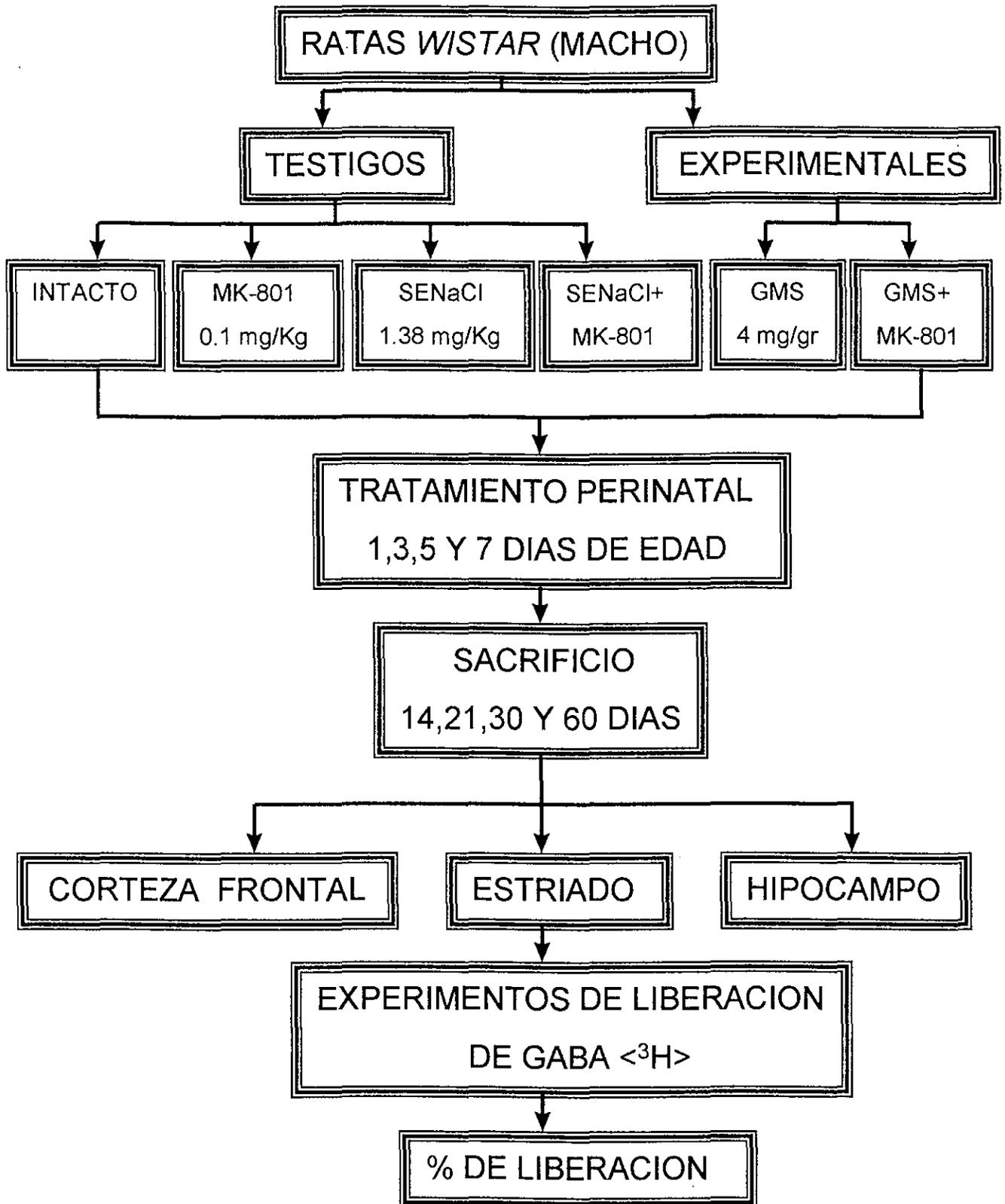
Los animales empleados se dividieron en siete grupos :

I Animales intactos, sin tratamiento alguno.

- II Administración subcutánea (sc) de una solución de NaCl equimolar a la del GMS (SENaCl) (1.38 mg/g de peso corporal) a los días 1, 3, 5 y 7 de la vida postnatal, una inyección diaria.
- III Administración sc de MK-801 (0.1 mg/kg de peso corporal) (103) en los días postnatales 1, 3, 5 y 7.
- IV Administración de GMS por vía sc (4 mg/g de peso corporal) en los días postnatales 1, 3, 5 y 7.
- V Administración sc de NaCl y MK-801 en las mismas dosis, los días postnatales 1, 3, 5, y 7.
- VI Administración de GMS y MK-801 por vía sc a las dosis antes descritas en los días postnatales 1, 3, 5 y 7.

A los 14, 21, 30 y 60 días después del tratamiento neonatal, una parte de los animales fueron sacrificados por decapitación, se extrajo el cerebro y se disecaron la corteza cerebral, estriado y el hipocampo. Durante la disección el tejido cerebral se mantuvo a 4°C en una solución de sacarosa 0.32 M.

## 7. DIAGRAMA EXPERIMENTAL



## 6.5 EXPERIMENTOS DE LIBERACION DE GABA - [3H]

Los experimentos de liberación de GABA se realizaron de acuerdo a Beas-Zárate y col (104). Consistieron en lo siguiente: las rebanadas del tejido (25 mg) se colocaron en 1ml de medio Krebs-bicarbonato (de recaptura) y se transfirieron a un baño María con agitación a 37°C para preincubarse por 10 min, después se les adicionó 10 µl de GABA-[<sup>3</sup>H] (10µM) y la incubación se prolongó por 20 min más. Al término de este tiempo las rebanadas de tejido se depositaron en un sistema de perfusión Brandel SP-06 y se hicieron dos lavados con medio Krebs-bicarbonato (con KCl 3mM); el primer lavado se realizó a una velocidad de 1.2 ml/min durante 5 min, mientras que el segundo lavado se realizó a 0.5 ml/min. Para cada región se emplearon dos vías de perfusión en paralelo; una de éstas para determinar la liberación basal mediante el empleo de medio Krebs-bicarbonato que contenía KCl (3mM) durante la recolección de 10 fracciones independientes de 5 min cada una y a un flujo 0.5 ml/min; en la otra vía se determinó la liberación estimulada, para ello se recolectaron las tres primeras fracciones para obtener la liberación basal, posteriormente en la fracción número 4 se cambió a un medio que contenía una concentración alta de KCl (53 mM) para inducir la liberación estimulada, finalmente se regresa al medio normal a partir de la fracción número 8 y se colectan dos fracciones más.

Al finalizar las recolecciones se agregó 5 ml de líquido de centelleo (cocktail Ready safe Beckman) y se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo líquido LS-6000SE.

Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje de GABA-[<sup>3</sup>H] liberado respecto a la cantidad total de GABA-[<sup>3</sup>H] incorporado en el tejido.

**A) COMPOSICION DE LOS MEDIOS EMPLEADOS EN LOS  
EXPERIMENTOS DE LIBERACION DE GABA**

RECAPTURA		LIBERACION BASAL		LIBERACION ESTIMULADA	
NaCl	10 mM	NaCl	115 mM	NaCl	65 mM
KCl	3 mM	KCl	3 mM	KCl	53 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.2 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.2 mM	MgSO <sub>4</sub>	1.2 mM	MgSO <sub>4</sub>	1.2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM	NaHCO <sub>3</sub>	25 mM	NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.5 mM	Glucosa	10 mM	Glucosa	10 mM
Glucosa	10 mM	CaCl <sub>2</sub>	1.5 mM	CaCl <sub>2</sub>	1.5 mM

### 6.6 ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos se procesaron mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y se expresaron como el promedio de 4-6 experimentos realizados  $\pm$  la desviación estándar de la media. El nivel de significancia aceptado fue de  $p < 0.05$  para considerar significativas las diferencias.

# **RESULTADOS**

## 8. RESULTADOS

Con respecto a la liberación basal de GABA-[<sup>3</sup>H], se graficaron solamente los resultados de aquellos grupos que fueron estadísticamente diferentes respecto al grupo testigo intacto. Además, en algunas gráficas en las que se muestra la liberación basal, se encontró que varios grupos testigos o experimentales mostraron un patrón de liberación muy similar, sin observarse diferencias estadísticamente significativas, por lo que se representó el valor promedio de esos grupos.

### **Corteza cerebral**

La administración de GMS indujo una reducción significativa en la liberación basal de GABA a los 14, 30 y 60 días de edad postnatal (EP) respecto al grupo testigo (Gráficas 1A, 2A y 2C). Por el contrario, la co-administración de GMS con MK-801 incrementó la liberación de GABA a los 14, 30 y 60 días (Gráficas 1A, 2A y 2C), tal incremento superó los niveles de liberación correspondientes al grupo testigo a los 14 y 60 días (Gráficas 1A y 2C). A los 30 días no se alcanzó el nivel de liberación basal del grupo testigo (Gráfica 2A). De igual forma, se encontró que la co-administración de NaCl con MK-801 indujo un incremento estadísticamente significativo en la liberación basal de GABA respecto al grupo testigo únicamente a los 60 días (Gráfica 2C). Finalmente se observó que a los 21 días no se modificó la liberación basal de GABA bajo ningún tratamiento (Gráfica 1C).

Por otro lado, los resultados referentes a la liberación estimulada de GABA, expresados como sobreflujo, muestran que tanto el tratamiento con GMS como la SENaCl indujeron una importante reducción en la liberación estimulada de GABA a los 14 y 21 días respecto al grupo testigo (Gráficas 1B

y 1D), tales reducciones se contrarrestan con la co-administración de MK-801, así; a los 14 días la combinación de GMS+MK-801 y NaCl+MK incrementaron la liberación estimulada de GABA en comparación al grupo testigo (Gráfica 1B), mientras que a los 21 días la combinación de NaCl+MK-801 no difiere de la liberación del grupo testigo (Gráfica 1D). A los 30 días el NaCl indujo una ligera reducción (estadísticamente significativa) en la liberación de GABA-[<sup>3</sup>H] (Gráfica 2B), que combinación con el MK-801 se incrementó respecto al grupo testigo (Gráfica 2B). A esta misma edad, el GMS indujo un incremento significativo en la liberación de GABA-[<sup>3</sup>H], efecto que se revirtió en combinación con el MK-801 (Gráfica 2B).

A los 60 días el NaCl no posee efecto sobre la liberación estimulada de GABA solo ó en combinación con MK-801(Gráfica 2D). Asimismo se observó que el GMS indujo un incremento en la liberación estimulada de GABA desde los 30 hasta los 60 días de en comparación al grupo testigo, en cambio la co-administración de GMS con MK-801 no modificó la liberación GABA-[<sup>3</sup>H] respecto al grupo testigo (Gráficas 2B y 2D). Finalmente se encontró que la administración de MK-801 sólo indujo un incremento en la liberación estimulada de GABA a los 14 días respecto al grupo testigo (Gráfica 1B), pero a los 30 y 60 días se observó una reducción significativa en la liberación de GABA-[<sup>3</sup>H], en comparación con el grupo testigo (Gráficas 2B y 2D).

## GRAFICA 1

Gráfica correspondiente a la liberación basal y estimulada de GABA- $^3\text{H}$  en corteza cerebral a los 14 y 21 días postnatales (EP) realizada en animales: intactos (T), tratados con: MK-801, SENaCl (NaCl), SENaCl+MK-801 (NaCl+MK-801), GMS y GMS+MK-801.

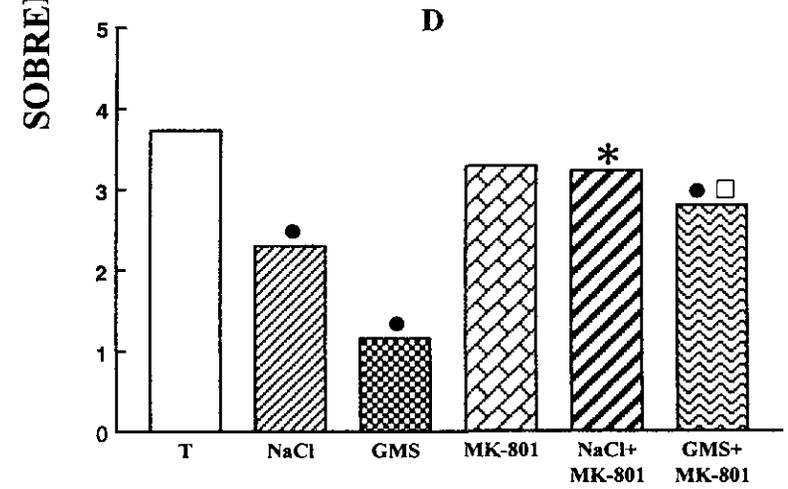
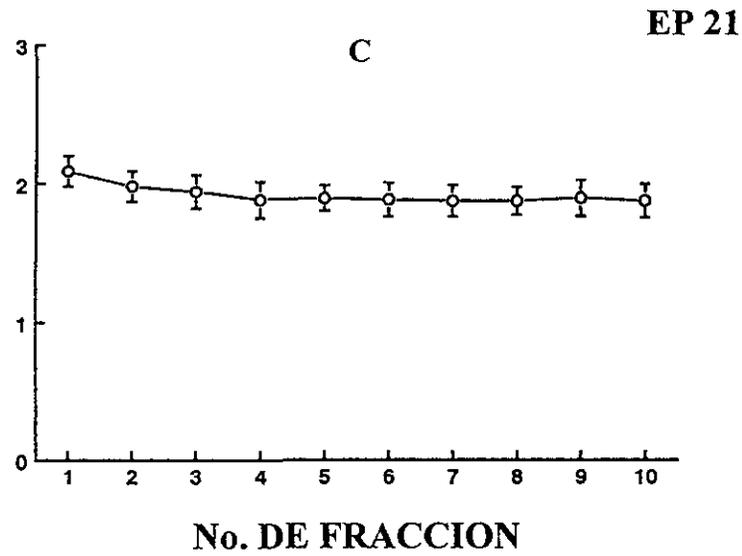
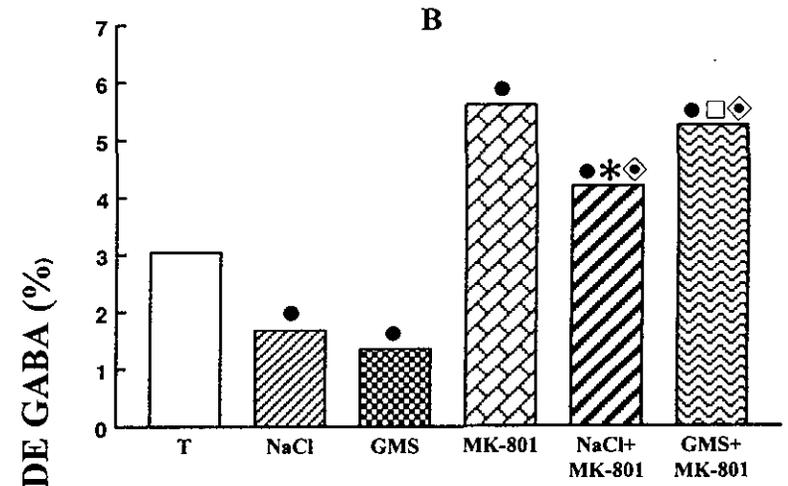
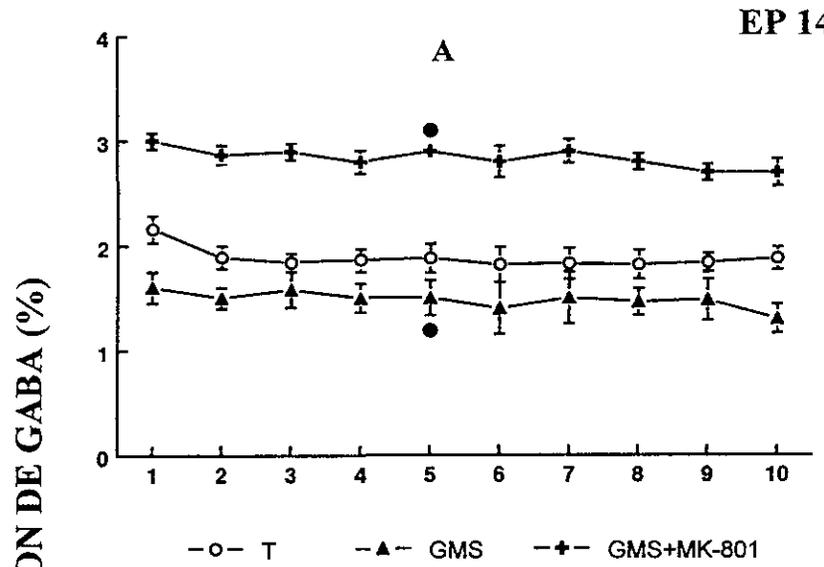
1A) Liberación basal a la EP14 y 1B) Liberación estimulada a la EP14

1C) Liberación basal a la EP21 y 1D) Liberación estimulada a la EP21

- $p < 0.05$  comparación vs testigo (T)
- \*  $p < 0.05$  NaCl+MK-801 vs NaCl
- $p < 0.05$  GMS+MK-801 vs GMS
- ◇  $p < 0.05$  comparado vs MK-801

1C) Las gráficas muestran la liberación basal del grupo testigo (T) debido a que el resto de los grupos no presentaron ninguna diferencia estadísticamente significativa respecto a este grupo.

CORTEZA CEREBRAL



## GRAFICA 2

Gráfica correspondiente a la liberación basal y estimulada de GABA-[<sup>3</sup>H] en corteza cerebral a los 30 y 60 días postnatales (EP) realizada en animales: intactos (T), tratados con: MK-801, SENaCl (NaCl), SENaCl+MK-801 (NaCl+MK-801), GMS y GMS+MK-801.

2A) Liberación basal a la EP30 y 2B) Liberación estimulada a la EP30

2C) Liberación basal a la EP60 y 2D) Liberación estimulada a la EP60

•  $p < 0.05$  comparación vs testigo (T)

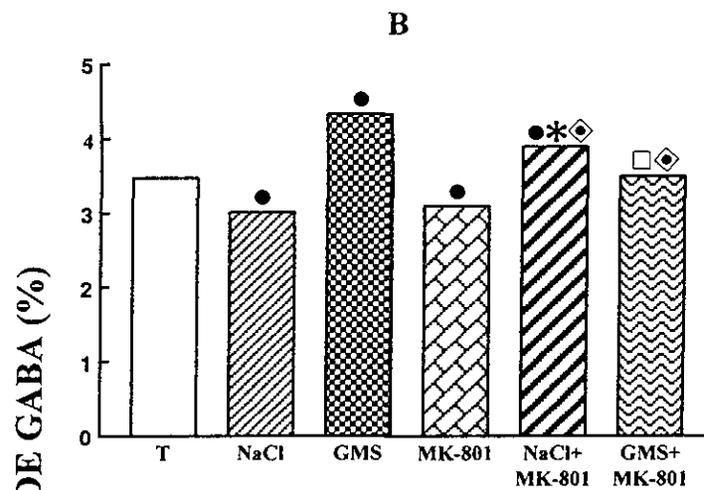
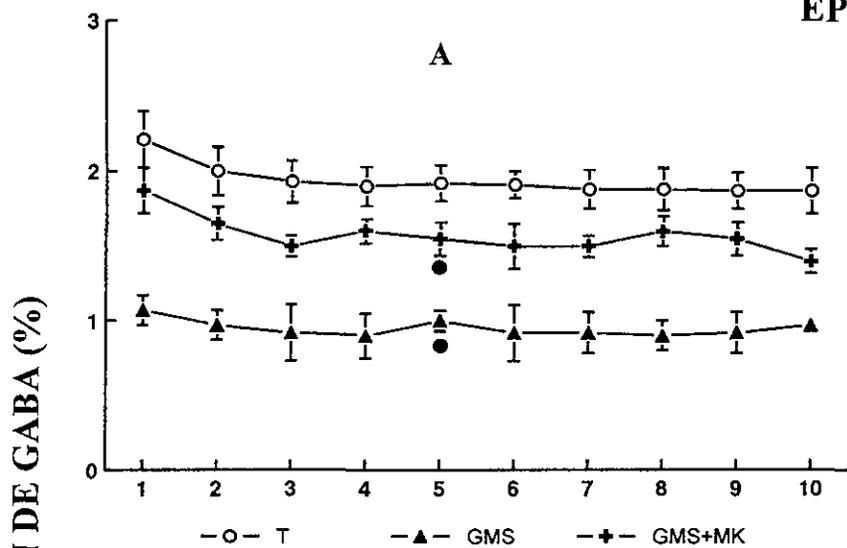
\*  $p < 0.05$  NaCl+MK-801 vs NaCl

□  $p < 0.05$  GMS+MK-801 vs GMS

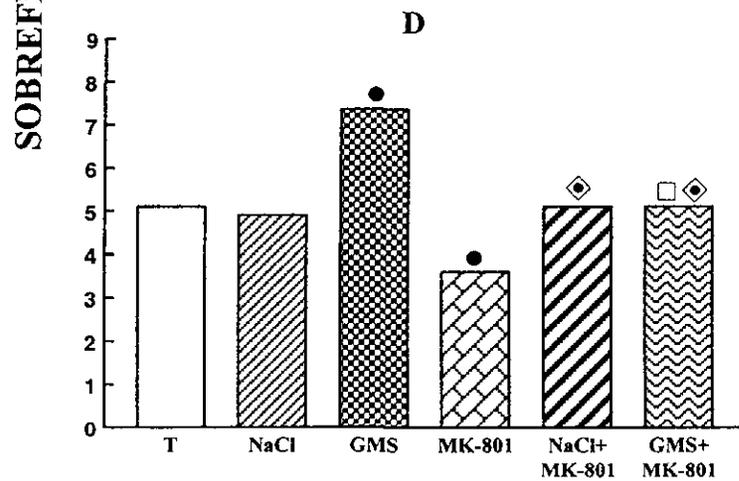
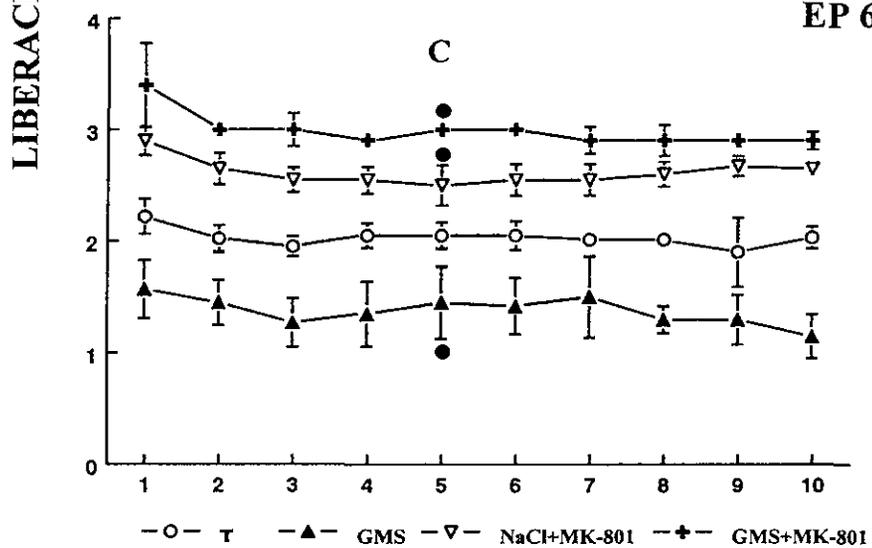
◇  $p < 0.05$  comparado vs MK-801

CORTEZA CEREBRAL

EP 30



EP 60



No. DE FRACCION

### **Estriado**

La liberación basal de GABA se redujo ligeramente a los 14 días en los animales tratados con GMS, GMS+MK-801 y los tratados únicamente con MK-801, en comparación al grupo testigo (Gráfica 3A); y sólo la co-administración de NaCl con MK-801 incrementó la liberación basal de GABA en relación al grupo testigo (Gráfica 3A). El resto de los grupos no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo testigo. En tanto que, a los 21, 30 y 60 días los resultados muestran que la liberación basal de GABA no se modificó bajo ningún tratamiento en comparación con el grupo testigo (Gráficas 3C, 4A y 4C).

En relación a la liberación estimulada de GABA, los resultados expresados como sobreflujo mostraron que a los 14 días, tanto el NaCl como el GMS redujeron la liberación de GABA. La administración del MK-801 en combinación con GMS incrementó dicha liberación de GABA en comparación al grupo testigo, en tanto que la combinación con NaCl produjo resultados semejantes a los observados con el grupo testigo (Gráfica 3B). Desde los 21 hasta los 60 días el NaCl y GMS redujeron la liberación estimulada de GABA, sin embargo la combinación de GMS con MK-801 revirtió parcialmente este efecto, sin alcanzar el nivel normal de liberación de GABA que se produjo en el grupo testigo (Gráficas 3D,4B y 4D). En esta región, el MK-801 incrementó la liberación estimulada de GABA a los 14 días respecto al grupo testigo (Gráfica 3B) en tanto que, a los 21 y 60 días se observó una reducción significativa en la liberación estimulada de GABA (Gráficas 3D y 4D).

## GRAFICA 3

Gráfica correspondiente a la liberación basal y estimulada de GABA-[<sup>3</sup>H] en estriado a los 14 y 21 días postnatales (EP) realizada en animales: intactos (T), tratados con: MK-801, SENaCl (NaCl), SENaCl+MK-801 (NaCl+MK-801), GMS y GMS+MK-801.

3A) Liberación basal a la EP14 y 3B) Liberación estimulada a la EP14

3C) Liberación basal a la EP21 y 3D) Liberación estimulada a la EP21

• p<0.05 comparación vs testigo (T)

\* p<0.05 NaCl+MK-801 vs NaCl

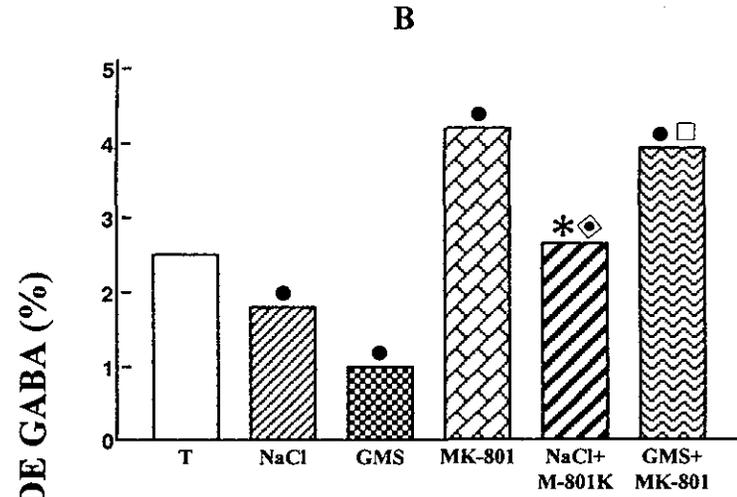
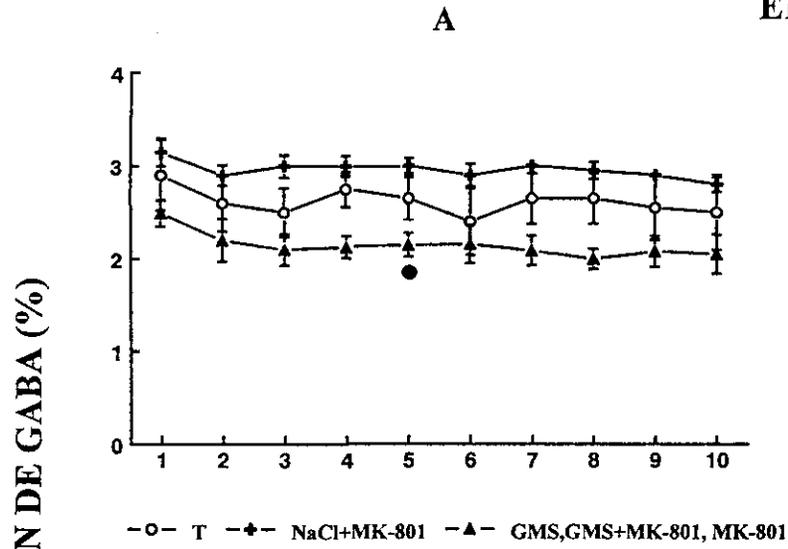
□ p<0.05 GMS+MK-801 vs GMS

◇ p<0.05 comparado vs MK-801

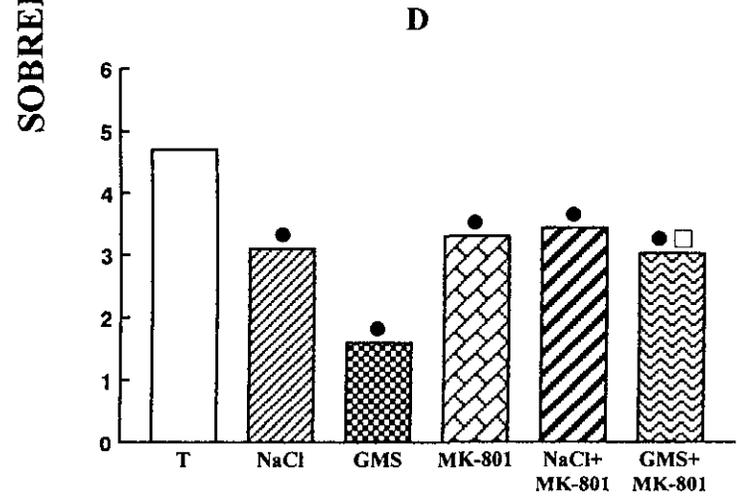
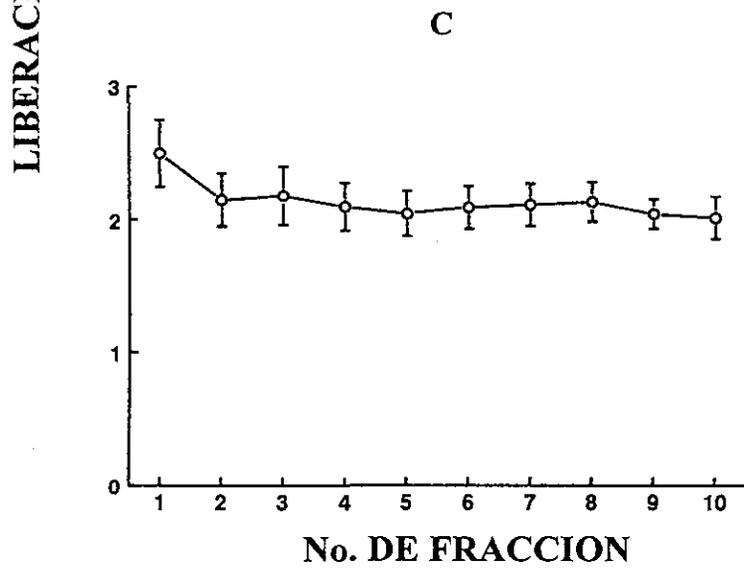
3C) Las gráficas muestran la liberación basal del grupo testigo (T) debido a que el resto de los grupos no presentaron ninguna diferencia estadísticamente significativa respecto a este grupo.

ESTRIADO

EP 14



EP 21



## GRAFICA 4

Gráfica correspondiente a la liberación basal y estimulada de GABA-[<sup>3</sup>H] en estriado a los 30 y 60 días postnatales (EP) realizada en animales: intactos (T), tratados con: MK-801, SENaCl (NaCl), SENaCl+MK-801 (NaCl+MK-801), GMS y GMS+MK-801.

4A) Liberación basal a la EP30 y 4B) Liberación estimulada a la EP30

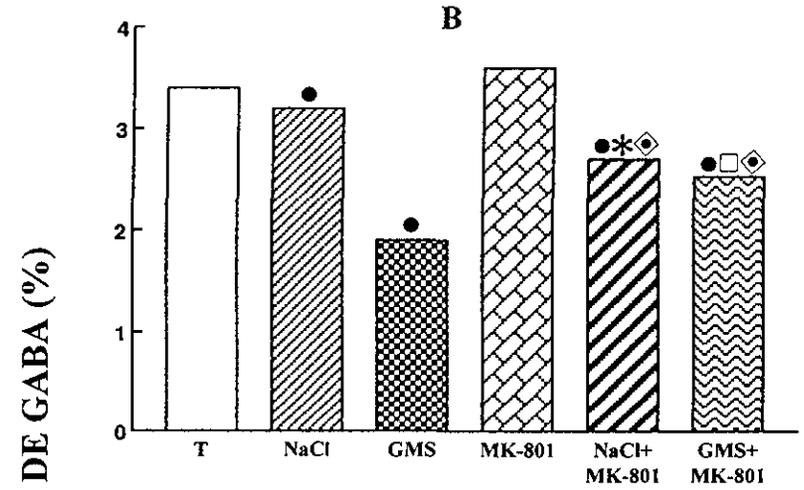
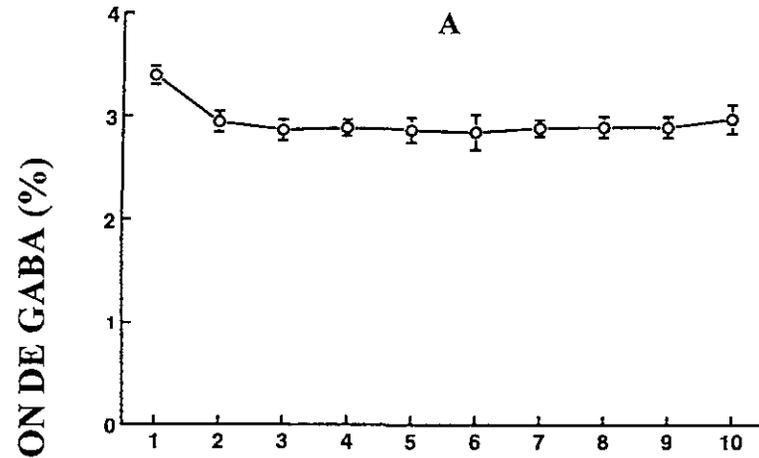
4C) Liberación basal a la EP60 y 4D) Liberación estimulada a la EP60

- $p < 0.05$  comparación vs testigo (T)
- \*  $p < 0.05$  NaCl+MK-801 vs NaCl
- $p < 0.05$  GMS+MK-801 vs GMS
- ◇  $p < 0.05$  comparado vs MK-801

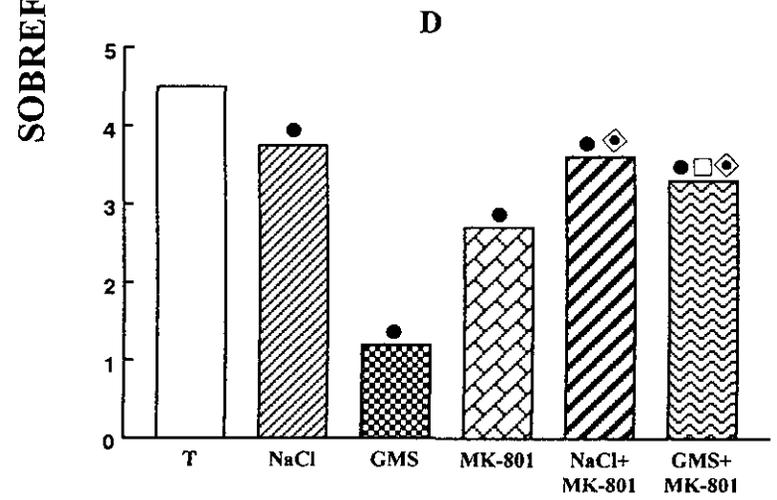
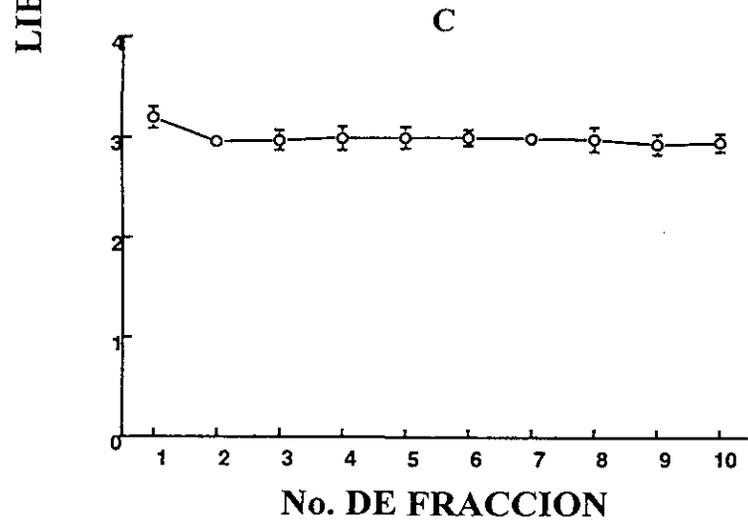
4A) y 4C) Las gráficas muestran la liberación basal del grupo testigo (T) debido a que el resto de los grupos no presentaron ninguna diferencia estadísticamente significativa respecto a este grupo.

CUERPO ESTRIADO

EP 30



EP 60



## Hipocampo

Los resultados mostraron que a los 14 días los grupos tratados con GMS o NaCl redujeron significativamente la liberación basal de GABA en comparación con el grupo testigo, mientras que en el resto de los grupos no se observó ningún efecto (Gráfica 5A). A los 21 días los grupos tratados con NaCl, GMS, MK-801 y la combinación de NaCl con MK-801 indujeron una reducción significativa en la liberación basal de GABA respecto al grupo testigo y en los grupos restantes no se observó ningún efecto (Gráfica 5C). A los 30 días el MK-801, la co-administración de GMS con MK-801 y el GMS redujeron la liberación basal respecto al grupo testigo, observándose en forma más evidente con el GMS; por el contrario, la combinación de NaCl con MK-801 incrementó la liberación basal en comparación al grupo testigo (Gráfica 6A).

Finalmente, a los 60 días se observó que el GMS redujo la liberación basal de GABA, en tanto que el MK-801 y la combinación de MK-801 con NaCl ó GMS incrementó la liberación basal de GABA respecto al grupo testigo (Gráfica 6C).

Por otro lado, en los resultados relacionados con la liberación estimulada de GABA se encontró que a los 14, 21 y 60 días en los grupos tratados con NaCl ó GMS se redujo significativamente la liberación estimulada de GABA (Gráficas 5B,5D y 6D), este efecto se contrarrestó parcialmente con la co-administración de MK-801 a los 14 días, ya que no se alcanzó el nivel de liberación del grupo testigo (Gráfica 5B), sin embargo, también se observó que a los 21 y 60 días el MK-801 contrarrestó parcialmente tal liberación, pero únicamente en combinación con GMS (Gráficas 5D y 6D). La combinación de NaCl con MK-801 a los 21 días no modificó la liberación estimulada observada solo con NaCl (Gráfica 5D), pero a los 60 días el MK-801 redujo la liberación en forma más significativa (Gráfica 6D). Por el contrario, a los 30 días, el NaCl o el GMS provocaron un incremento en la liberación estimulada de GABA en

comparación con el grupo testigo, tal incremento se redujo en el grupo de animales a los que se les co-administró GMS con MK-801 (Gráfica 6B). En el grupo tratado con MK-801 se produjo una reducción estadísticamente significativa en la liberación estimulada de GABA a los 14, 21 y 60 días, mientras que a los 30 días no resultó ninguna diferencia respecto al grupo testigo (Gráficas 5B,5D y 6D).

## GRAFICA 5

Gráfica correspondiente a la liberación basal y estimulada de GABA-[<sup>3</sup>H] en hipocampo a los 14 y 21 días postnatales (EP) realizada en animales: intactos (T), tratados con: MK-801, SENaCl (NaCl), SENaCl+MK-801 (NaCl+MK-801), GMS y GMS+MK-801.

5A) Liberación basal a la EP14 y 5B) Liberación estimulada a la EP14

5C) Liberación basal a la EP21 y 5D) Liberación estimulada a la EP21

• p<0.05 comparación vs testigo (T)

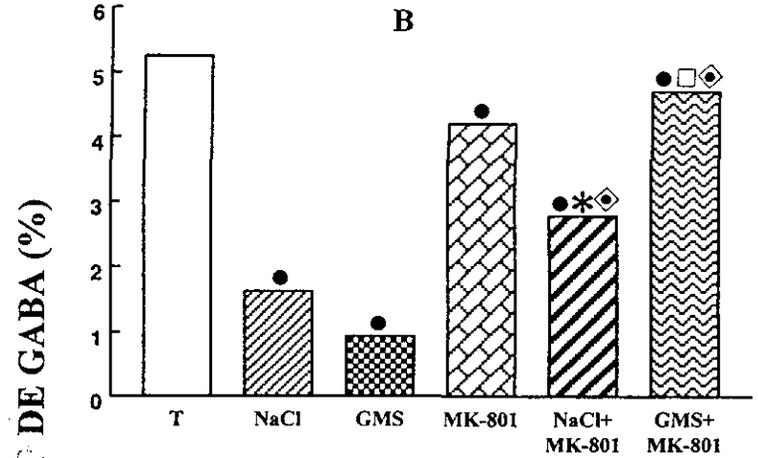
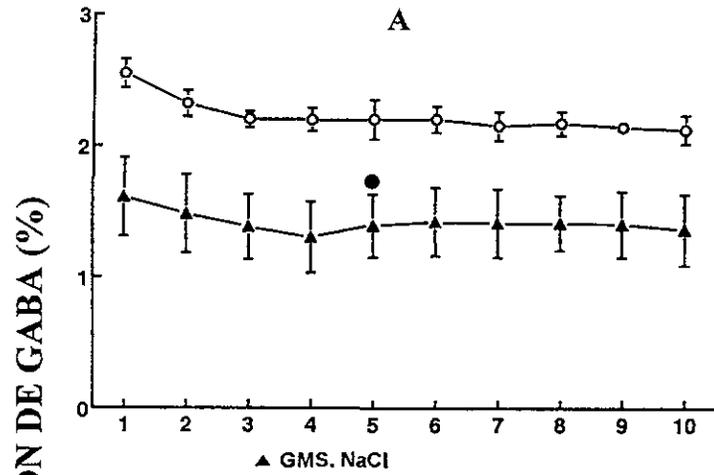
\* p<0.05 NaCl+MK-801 vs NaCl

□ p<0.05 GMS+MK-801 vs GMS

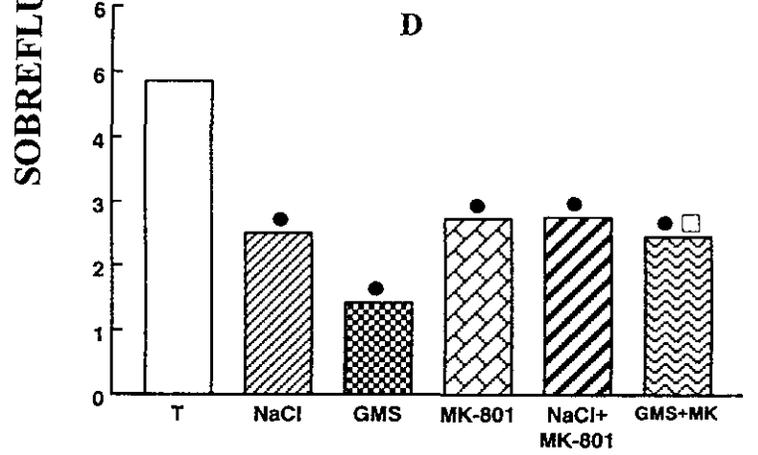
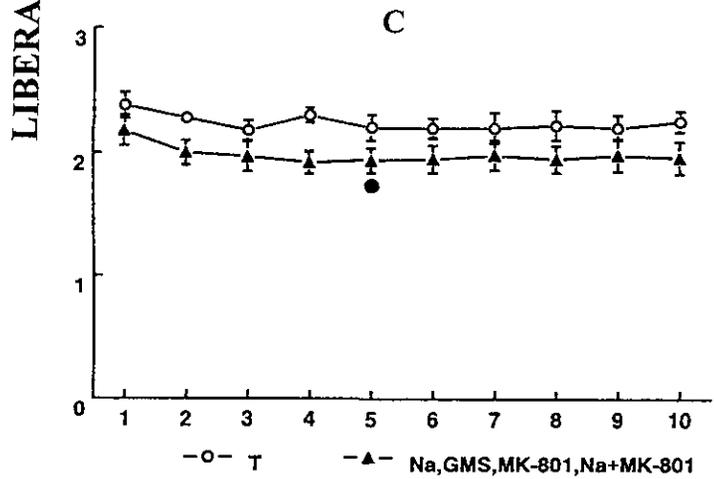
◇ p<0.05 comparada vs MK-801

HIPOCAMPO

EP 14



EP 21



No. DE FRACCION

## GRAFICA 6

Gráfica correspondiente a la liberación basal y estimulada de GABA-[<sup>3</sup>H] en hipocampo a los 30 y 60 días postnatales (EP) realizada en animales: intactos (T), tratados con: MK-801, SENaCl (NaCl), SENaCl+MK-801 (NaCl+MK-801), GMS y GMS+MK-801.

6A) Liberación basal a la EP30 y 6B) Liberación estimulada a la EP30

6C) Liberación basal a la EP60 y 6D) Liberación estimulada a la EP60

• p<0.05 comparación vs testigo (T)

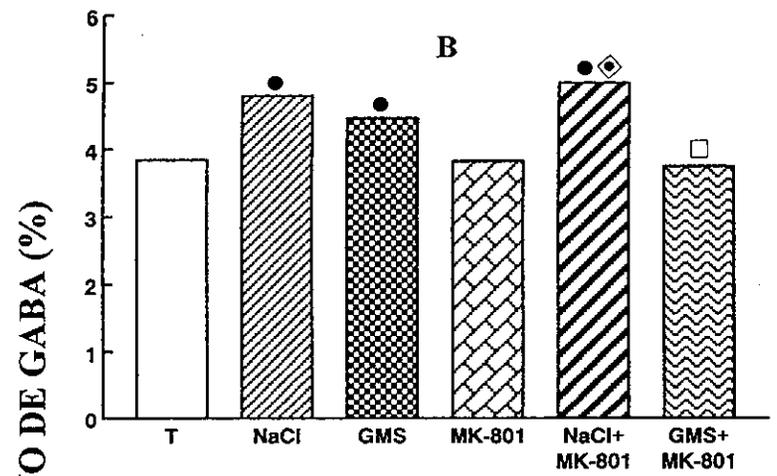
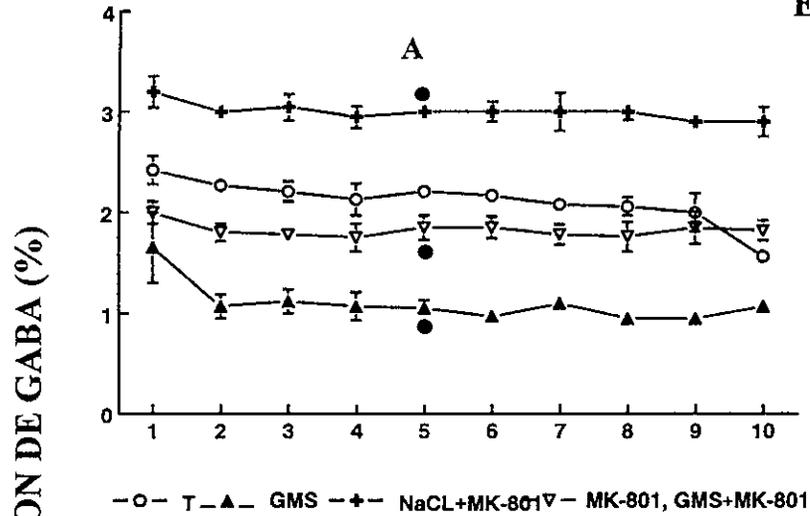
\* p<0.05 NaCl+MK-801 vs NaCl

□ p<0.05 GMS+MK-801 vs GMS

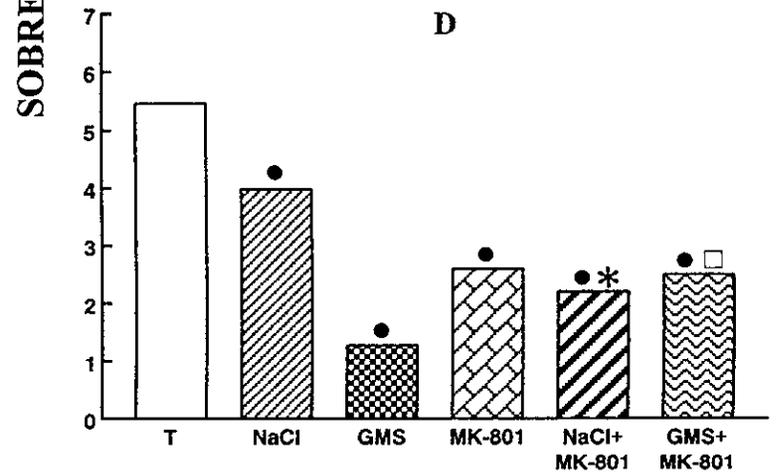
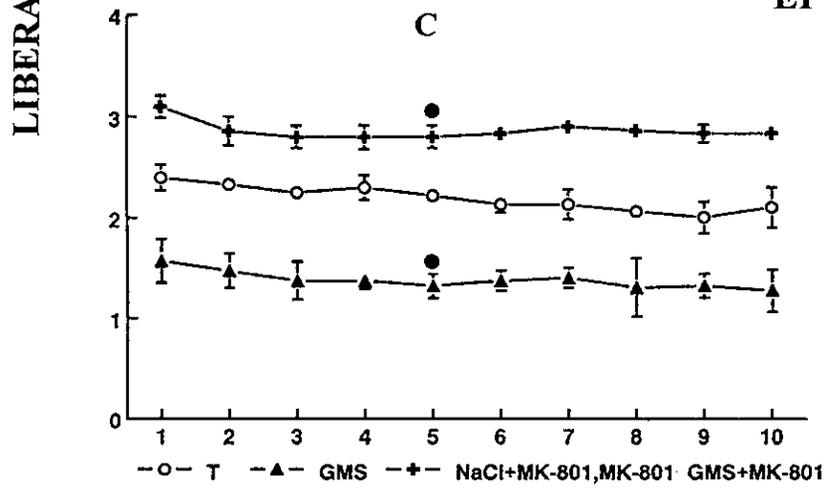
◇ p<0.05 comparado vs MK-801

HIPOCAMPO

EP 30



EP 60



No. DE FRACCION

# **DISCUSSION**

## 9. DISCUSION

Actualmente se conoce que el Glu media la excitación neuronal en la mayoría de las sinapsis del SNC de los mamíferos (105), sin embargo, la relevancia de esta molécula no solo radica en su participación en procesos fisiológicos a través de sus diferentes subtipos de receptores, sino también en sus efectos neurotóxicos (106). De manera particular se ha destacado al R-NMDA debido a que es un subtipo de receptor a Glu que participa en eventos de suma importancia como son el crecimiento y la migración neuronal (107), así como el establecimiento de la arquitectura neuronal (108) durante el desarrollo del SNC. Por otro lado, a este receptor también se le ha implicado en diversos procesos neuropatológicos (109).

Con base en lo anterior, puede considerarse entonces que una alteración en los niveles óptimos de Glu podrían modificar no sólo el establecimiento de circuitos neuronales, sino también favorecer el desarrollo de trastornos neurológicos en la edad adulta. Así, el presente trabajo se realizó con el propósito de analizar los efectos resultantes de la administración neonatal de Glu, así como el bloqueo de los R-NMDA con MK-801, sobre la liberación de GABA en regiones con inervación glutamatérgica, como son la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo durante el desarrollo del SNC de la rata.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el GMS modificó el patrón normal de liberación de GABA en las diferentes regiones que se analizaron en las distintas etapas del desarrollo postnatal, lo que a su vez sugiere una alteración en el desarrollo de las neuronas GABAérgicas.

En el caso de la corteza cerebral, el GMS redujo en forma importante la liberación basal y estimulada de GABA en los primeros 21 días de vida. Por otro lado, el efecto del GMS fue menos severo después de los 30 días, debido

a que únicamente se redujo la liberación basal de GABA, y la estimulada se restablece totalmente.

Estos resultados en su conjunto muestran que, en la corteza cerebral las células GABAérgicas fueron susceptibles al Glu, principalmente en etapas tempranas del desarrollo (en las primeras tres semanas) y que éste efecto es mediado por los R-NMDA, ya que cuando se redujo la liberación de GABA basal o estimulada, el MK-801 revirtió este efecto.

La susceptibilidad que se refleja en los primeros 21 DP con una reducción marcada en la liberación de GABA probablemente se relacione con una lesión y/o pérdida de células GABAérgicas, ya que diversos estudios muestran que la administración postnatal de Glu durante la primera semana de edad induce efectos citotóxicos sobre diversos tipos de neuronas, por lo que se propone que en etapas tempranas del desarrollo existe mayor susceptibilidad al daño inducido por Glu (110), esto posiblemente se debe a que los sistemas de recaptura para el Glu no están completamente desarrollados y a que la barrera hematoencefálica no está totalmente establecida (110).

Por otro lado, estudios recientes muestran que los receptores a Glu están presentes en el SNC desde etapas muy tempranas del desarrollo (111,112), tal es el caso del R-NMDA, al cual se le ha implicado en la reorganización y remodelación sináptica durante las primeras 3 semanas de edad postnatal en la rata (113). Sin embargo, se conoce que la activación de éste receptor produce un incremento en la concentración intracelular de calcio, al cual se le ha implicado con la toxicidad y la muerte neuronal.

Aunado a ello, se ha observado que dentro de la corteza a partir del día 3 y hasta los 21 días de vida postnatal, existe un importante crecimiento dendrítico asociado con la aparición de circuitos neuronales intrínsecos tipo GABAérgico, así como la presencia de receptores tipo GABA<sub>A</sub> (114,115), por lo tanto, si se toma en cuenta lo mencionado anteriormente, puede considerarse que la sobreactivación de los R-NMDA en los primeros días de edad postnatal

podiera constituir un factor importante en el establecimiento de la arquitectura y la comunicación interneuronal, y consecuentemente modificar en forma determinante la fisiología de las sinapsis de tipo GABAérgico. En este sentido, es probable que la reducción en la liberación de GABA en la corteza cerebral sea producto de una pérdida de células GABAérgicas inducida por GMS vía R-NMDA en etapas de desarrollo temprano de la corteza cerebral. Por otro lado, es probable que la reducción en la liberación de GABA sea resultado de una alteración a nivel de la síntesis del GABA. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio (en preparación) muestran que a los 21 días el GMS reduce la actividad de la GAD en la corteza cerebral, debido a una disminución en la cantidad y en la afinidad de la GAD por el sustrato.

Por otro lado, los resultados que se obtuvieron a los 30 y 60 días, probablemente se deben a una respuesta de tipo plástico por parte de las neuronas GABAérgicas que prevalecen ante el efecto que induce el Glu. Estas neuronas probablemente incrementan su eficiencia sináptica para liberar más GABA como una forma de compensación funcional de las neuronas dañadas. La ligera reducción que indujo la combinación de GMS y MK-801 sobre la liberación estimulada de GABA a los 30 y 60 días probablemente sean el resultado de daño inducido por el MK-801 a células GABAérgicas. Al respecto, estudios realizados por McDonald y colaboradores (116) muestran que en presencia de NMDA, el MK-801 tiene la capacidad de inducir un incremento rápido y persistente en la unión de Glu, esto conduce a que el cerebro sea más sensible al daño y a que decline el efecto neuroprotector del MK-801.

Con referencia a la región del estriado, los resultados indican que es una región susceptible a la administración neonatal de GMS, ya que éste redujo la liberación estimulada de GABA en todas la etapas estudiada del desarrollo postnatal. Sin embargo, esta reducción parece ser sólo en la capacidad de respuesta de las células para liberar GABA, ya que la liberación basal prácticamente no se modificó durante el desarrollo. El efecto que indujo

el GMS en ésta región parece estar mediado en parte por los R-NMDA, ya que el MK-801 lo revierte parcialmente. Al respecto, existen trabajos que muestran que la composición del R-NMDA varía durante el desarrollo del SNC (117). Se ha demostrado que el R-NMDA está constituido por la combinación de dos tipos de subunidades denominadas como NMDAR1 (NR1) y NMDAR2 A-D (NR2A-NR2D) (118,119) y se ha concluido que la subunidad NR1 es esencial para formar R-NMDA funcionales, mientras que las subunidades NR2 son las determinantes moleculares para la diversidad funcional (120). Además, se ha demostrado que la toxicidad o daño inducido por agonistas a Glu es mayor cuando se coexpresan NR1/ NR2A o NR1/NR2B, sin embargo la toxicidad es menor en el último caso (121,122). Las combinaciones de las subunidades y el incremento en la toxicidad se correlacionan con un incremento en la permeabilidad del calcio a través de los receptores (123). Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio muestran que el GMS induce un incremento significativo en la expresión del RNAm que transcribe a las subunidades NR1, NR2A y NR2B (en preparación) en el estriado en la etapa adulta. Estos resultados apoyan la posibilidad de que el GMS puede modificar el nivel de expresión de las subunidades del R-NMDA con repercusiones en la eficiencia sináptica de las células GABAérgicas. A su vez, no se descarta la posibilidad de que el efecto que induce el GMS podría estar mediado por los receptores del tipo No-NMDA (R No-NMDA) ó tipo metabotrópico, debido a que existe una serie de estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* que sugieren que la estimulación excesiva de los R no-NMDA puede dañar o destruir las neuronas (124).

Por los resultados que se obtuvieron, puede deducirse que el hipocampo fue la región cerebral más vulnerable a la administración de GMS. El efecto que induce el GMS está mediado parcialmente por los R-NMDA. En esta región, la liberación tanto basal como estimulada de GABA se redujeron significativamente a los 14 y 21 DP, hecho que sugiere pérdida de células GABAérgicas, además; bajo estas circunstancias el MK-801 no antagoniza

totalmente éste efecto. Sin embargo, a los 30 DP se observa únicamente un incremento en la liberación estimulada, esto probablemente se deba al desarrollo de mecanismos compensatorios de las células GABAérgicas que permanecen viables como parte del fenómeno de plasticidad neuronal. Lo anterior se apoya con estudios en los que se propone que, aun cuando los circuitos neuronales están totalmente establecidos, algunas sinapsis pueden modificar sus propiedades como resultado de una alteración en la actividad neuronal. Los mecanismos compensatorios pueden presentarse como un decaimiento en la actividad sináptica o una facilitación de la misma (125). Sin embargo, en el hipocampo éste proceso plástico es de corto plazo, ya que la liberación de GABA se reduce en forma muy evidente en la etapa adulta y el MK-801 no revirtió totalmente éste efecto, lo que indica un daño marcado y la insuficiencia de la respuesta de las células GABAérgicas hipocampales.

Por otro lado, se conoce que el GABA permite el influjo de iones  $Cl^-$  a través de los receptores  $GABA_A$  en el hipocampo de animales adultos y esto conduce a una hiperpolarización (126). Sin embargo, se ha observado que en el hipocampo prevalece una situación totalmente diferente durante la primera semana de edad postnatal, en esta etapa temprana del desarrollo, la activación de receptores  $GABA_A$  induce efectos excitadores y virtualmente media toda la actividad excitadora de las células hipocampales (127), con base en ello se ha sugerido que el GABA en etapas tempranas del desarrollo posee un papel trófico, en el que se promueve el brote neurítico y la diferenciación de los diversos tipos de neuronas (128). Algunos estudios sugieren que el GABA despolariza células piramidales hipocampales mediante un incremento en la concentración intracelular de calcio, a través de la activación de canales para calcio sensibles a voltaje, éste influjo es necesario para el desarrollo morfológico de las neuronas hipocampales en una etapa temprana del desarrollo, en la que las conexiones excitadoras están pobremente desarrolladas (129). Además, se ha demostrado que el Glu se relaciona con el brote de neuronas hipocampales en cultivo (77) y diversas observaciones

sugieren que este efecto está mediado por una despolarización y un influjo de calcio (130). Por tanto, es probable que en una edad temprana del desarrollo la actividad despolarizante del GABA, el influjo de calcio mediado por GABA vía canales sensibles al voltaje, la sobreexcitación y el influjo masivo de calcio a través de los R-NMDA, excedan la concentración intracelular de calcio necesaria para el desarrollo neuronal, y por el contrario contribuyan al desarrollo potencial de un proceso patológico sobre las sinapsis GABAérgicas, hecho que se refleja en una liberación reducida de GABA. Además, no se descarta la participación adicional de los R No-NMDA a través de un incremento de calcio por los canales sensibles al voltaje, ya que con la administración del MK-801 solo ó en combinación con GMS, no restablece totalmente la liberación estimulada de GABA.

Asimismo, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio muestran que el GMS induce un incremento significativo en la expresión del RNAm que transcribe a las subunidades NR1, NR2A y NR2B en el hipocampo de animales en la edad adulta. Esta combinación incrementa la permeabilidad del calcio a través de los R-NMDA, por lo que estos resultados sugieren la posibilidad de que las neuronas GABAérgicas puedan sufrir daño neuroexcitotóxico, que se manifiesta por una reducida liberación estimulada de GABA.

Finalmente, y con relación al grupo tratado con NaCl, los resultados muestran que la liberación de GABA se modificó en las tres regiones estudiadas. El efecto del NaCl parece afectar la capacidad de respuesta de las células GABAérgicas, ya que mientras que la liberación estimulada de GABA se redujo significativamente, la liberación basal de GABA prácticamente no se modificó. El Na<sup>+</sup> juega un papel importante en varios mecanismos de transporte, entre ellos puede destacarse la recaptura de aminoácidos, que permite elevar la concentración de los aminoácidos en el espacio extracelular (131). Algunos estudios muestran que la exposición de las células a soluciones hipertónicas produce una serie de consecuencias como: reducción

del volumen celular, alteración del pH y cambios en la expresión de genes en diversos tipos celulares (132). Existen también estudios que demuestran que la concentración extracelular de algunos aminoácidos puede ser afectada por cambios osmóticos en el microambiente (133), por ejemplo, en condiciones *in vitro*, las células nerviosas liberan glicina (Gli) y taurina como respuesta a un medio hiperosmótico (134). Asimismo, la estimulación de los núcleos paraventricular y supraóptico con alta concentración de NaCl por microdiálisis induce un incremento en la liberación de vasopresina y oxitocina (135), así como de la Gln, el GABA, el aspartato y el Glu en el estriado y el hipocampo de ratas (131). Con base en lo anterior, se puede considerar que el efecto del NaCl que se observó en la liberación de GABA pudiera estar relacionado con la liberación masiva de Glu y éste a su vez alterar la expresión de las subunidades de los propios receptores a Glu, sin embargo, se requieren trabajos adicionales para dilucidar el mecanismo a través del cual el NaCl modifica la liberación de GABA.

# **CONCLUSIONES**

## 10. CONCLUSIONES

1.- En la corteza cerebral, las células GABAérgicas fueron susceptibles al Glu principalmente en etapas tempranas del desarrollo (tres primeras semanas). El efecto que induce el Glu está mediado por los R-NMDA ya que la reducción que se observó en la liberación basal y estimulada se revierte con MK-801.

2.- En el cuerpo estriado el Glu indujo una reducción en la liberación estimulada de GABA en todas las etapas del desarrollo que se analizaron. Esta reducción parece ser sólo en la capacidad de respuesta de las células GABAérgicas. El efecto del Glu parece estar mediado por los R-NMDA ya que la co-administración con MK-801 lo inhibe.

3.- El hipocampo fue la región cerebral más vulnerable a la administración del Glu. El efecto del Glu está mediado parcialmente por los R-NMDA.

4.- La SENaCl redujo la liberación estimulada de GABA en las tres regiones que se analizaron, por lo que el efecto del NaCl parece alterar la capacidad de respuesta de las células GABAérgicas.

### CONCLUSION GENERAL DEL TRABAJO

Los resultados muestran que el Glu modifica el patrón normal de liberación de GABA en las diferentes etapas del desarrollo postnatal de las regiones que se analizaron, lo que sugiere una alteración en el desarrollo de las células GABAérgicas. Este efecto involucra una importante participación de los R-NMDA.

# **BIBLIOGRAFIA**

## 11. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Smith, C.U. (1996). Elements of Molecular Neurobiology, Ed. J. & Sons, England. p.p. 318-349.
- 2.- Roberts, E. y Frankel, S. (1950). Gamma-Aminobutyric Acid in Brain: Its Formation From Glutamic Acid. J. Biol. Chem. 187:55-63.
- 3.- Awapara, J., Landua, A., Fuerst, R. y Seale, B. (1950). Free Gamma-Aminobutyric Acid in Brain. J. Biol. Chem. 187 :35-39.
- 4.- Tapia, R. (1983). "Acido  $\gamma$ -aminobutírico" en: Aminoácidos y Péptidos en la Integración del Sistema Nervioso. (Pasantes-Morales, H. y Aréchiga, H. eds.) UNAM, México. p.p. 57-82.
- 5.- Young, A.B. y Chu, D. (1990). Distribution of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors in mamalian brain: Potential targets for drug development. Drug Dev.Res.21 :161-167.
- 6.- Krnjevic, K. (1981). Transmitters in motor systems, in Handbook of Physiology, Section 2, The Nervous System, Volume II, Motor Control (V.B. Brooks, ed.). Am. Physiol. Soc., Baltimore. p.p. 107-154.
- 7.- Cowan, R. L., Wilson, C.J. y Heizmann, C.W. (1990). Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. J. Comp. Neurol. 302 :197-205.
- 8.- Chan, P. y Köhler, C. (1989). The hippocampus, New vistas. De. Alan R.Liss. Inc.p.p. 107-111.
- 9.- Baxter, C. F. y Roberts, E. (1959). Elevation of gamma-aminobutyric acid in rat brain with hydroxylamine. Proc. Soc. Exp. Biol. 101 : 811-815.
- 10.- Baxter, C. F. y Roberts, E. (1960). Demonstration of thicarbazide-induced convulsions in rats with elevated brain levels of gamma-aminobutyric acid. Proc. Soc. Exp. Biol. 104 :426-427.

- 11.- Krz'alic, L., Mandic', V. y Mihailovic', L. (1962). On the glutamine and gamma-aminobutyric contents of various regions of the cat brain. *Experientia*, 18 :368-369.
- 12.- Singh, S. I. y Malhotra, C. L. (1962). Amino acid content of monkey brain I. General pattern and quantitative value of glutamic acid, glutamine, gamma-aminobutyric acid and aspartic acid. *J. Neurochem.* 9 :37-42.
- 13.- Stynsky, I. A. y Thinh, N. T. (1964). Distribution of gamma-aminobutyric acid in the monkey brain during picrotoxin induced seizures. *J. Neurochem.* 11 :551-556.
- 14.- Fahn, S. y Côté, L. J. (1968). Regional distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) in brain of the rhesus monkey. *J. Neurochem.* 15 :209-213.
- 15.- Robinson, M.B. y Coyle, J.T. (1987). Glutamate and related acidic excitatory neurotransmitters: from basic science to clinical application. *FASEB.* 1:446-455.
- 16.- Bu, D-F., Erlander, M.G., Hitz, B.C., Tillakaratne, N.J.F. ; Kaufman, D.L., Wagner-McPherson, C.B., Evans, G.A y Tobin, A.J. (1992). Two human glutamate descarboxylases , 65-kDa GAD and 67-kDa GAD are each encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 :2115-2119.
- 17.- Erlander, M.G. y Tobin, A. J. (1991). The structural and functional heterogeneity of glutamic acid descarboxylase: a review. *Neurochem. Res.* 16:215-226.
- 18.- Erlander, M.G., Tillakartne, N.J.F., Feldblum, S., Patel, N. y Tobin, A.J. (1991). Two genes encode distinct glutamate descarboxylases. *Neuron.* 7 :91-100.
- 19.- Wyborski, R. J., Bond, R. W. Y Gottlieb, D. I. (1990). Characterization of a cDNA coding for a rat glutamic acid descarboxylase. *Mol. Brain Res.* 8 :193-198.

- 20.- Martin, D.L. y Rimvall, K. (1993). Regulation of gamma-aminobutyric acid shynthesis in the brain. *J. Neurochem.* 60:395-407.
- 21.- Rimvall, K ; Sheikh, S.N. ; Martin, D.L. (1993). Effects of increased  $\gamma$ -aminobutyric acid levels on GAD<sub>67</sub> protein and mRNA levels in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 60:714-720.
- 22.- Verhage, M. ; Besselsen, E. ; Lopes da Silva F. y Ghijsen WEJM. (1989). Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of presynaptic stimulus-secretion coupling. *J. Neurochem.* 53:1188-1194.
- 23.- Nicholls, D.G. (1989). Release of glutamate, aspartate and  $\gamma$ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 52:331-334.
- 24.- Meyer, D.K. (1991). Non exocytotic release of  $\gamma$ -aminobutyric acid: implications for volume transmission In: *Volume Transmission in the Brain* (Eds. Fuxe K y Agnati LF), p.p. 433-440. Raven Press, New York.
- 25.- Kandel, E.R.. (1981). Synaptic Transmittion II. Presynaptic factors controlling transmitter release. In: *Principles of Neuronal Sciences*, (Eds. Kandel, E.R. y Schwartz, J.H.) p.p. 81-90.
- 26.- Fagg, G. E y Foster, A.C. (1983). Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neurosci.* 26:701-709.
- 27.- Krogsgaard-Larsen, P ; Neilsen, L. ; Falch, E. y Sorgensen, F. J. (1988). Molecular pharmacology of GABA and GABA synaptic mechanisms. In: *Lunt ,G.G.,de Neurotox 88: Molecular basis drug and pesticide action.* Amsterdam: Elsevier ; p.p. 145-155.
- 28.- Barker, J.L.; Harrison, N.L.; Lange, G.D.; Majewska, M.D. y Owen, G. (1986). Voltage-clamp studies of GABA-activated chloride conductance by the steroid anaesthetic alphaxalone and a

- reduced metabolite of progesterone in cultured rat C.N.S. Neurones. *J.Physiol.*, 377:p.p.83.
- 29.- Callachan, H.; Cottrell, G.A.; Hather, N.Y.; Lambert, J.J., Nooney, J.M. y Peters, J.A. (1987). Modulation of the GABA<sub>A</sub> receptor by progesterone metabolites. *Proc.R.Soc.Lond.*, B231:359-369.
  - 30.- Corda, M.G.; Concas, A.; Biggio, G. (1985). Selective blockade of benzodiazepine receptors by Ro15-1788 prevents foot shock induced decrease of low affinity  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors. *Neurosci.Lett.* 56:265-269.
  - 31.- DiScala, G.; Schmitt, P. y Karli, P. (1984). Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into paraventricular structures. *Brain Res.* 309:199-208.
  - 32.- Mintz, I. M. y Bean, B.P. (1993a). GABA<sub>B</sub> receptor inhibition of P-type Ca<sup>2+</sup> channels in central neurons. *Neuron* 10:889-898.
  - 33.- Swartz, K.J. (1993). Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. *Neuron* 11:305-320.
  - 34.- Davies, C.H. ; Davies, S.N. y Collingridge, G.L. (1990). Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *J. Physiol. Lond.* 424:513-531.
  - 35.- Harrison, N.L. (1990). On the presynaptic action of baclofen at inhibitory synapses between cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol. Lond.* 422:433-446.
  - 36.- Dutar, P. y Nicoll, R.A. (1988b). Pre- and post- synaptic GABA<sub>B</sub> receptors in the hippocampus have a different pharmacological properties. *Neuron* 1:585-591.

- 37.- Isaacson, J.S. ; Solis, J.M. y Nicoll, R.A. (1993). Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* 10:165-175.
- 38.- Bormann, J. y Feigenspan, A. (1995). GABA<sub>C</sub> receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 18:515-519.
- 39.- Rabow, L.E. ; Russek, S.J. y Farb, D.H. (1995). From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABA<sub>A</sub> receptor research. *Synapse* 21:189-274.
- 40.- Erdo, S.L. y Bowery, N.G. ;eds. (1986). GABAergic mechanisms in the mammalian periphery. New York: Raven.
- 41.- Fargeas, M.J. ; Fioramonti, J. y Bueno, L. (1988). Central and peripheral action of GABA-A and GABA-B agonists on small intestine motility in rats. *Eur.J.Pharmacol.* 150:163-169.
- 42.- Blavet, N. ; DeFeudis, F.V. y Cisotre, F. (1987). THIP inhibits food intake in the rat. In: Okada, Y. y Roberts, E., eds. *Problems in GABA research: From brain to bacteria.* Amsterdam: Excerpta Medica ; p.p. 96-101.
- 43.- Gale, K. y Casu, M. (1981). Dynamic utilization of GABA in substantia nigra: regulation by dopamine and ABA in the striatum, and its clinical and behavioral implications. *Mol. Cell. Biochem.* 39:369-405.
- 44.- Scheel-Krueger, J. (1986). Dopamine-GABA interactions: evidence that GABA transmits, modulates and mediates dopaminergic functions in the basal ganglia and limbic system. *Acta Neurol. Scand.* 73 (Suppl.107):9-54.
- 45.- Erdo, S.L. ; Varga, B. y Horvath, E. (1985). Effect of local GABA administration on rat ovarian blood flow, and on progesterone and estradiol secretion. *Eur. J. Pharmacol.* 111:397-400.

- 46.- Brioni, J.D. ; Nagahara, A.H. y McGaugh, J.L. (1989). Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. *Brain Res.* 487:105-112.
- 47.- Castellano, C. ; Brioni, J.D. ; Nagahara, A.H. y McGaugh, J.L. (1989). Post-training systemic and intra-amygdala administration of the GABA-B agonist baclofen impairs retention. *Behav. Neural Biol.* 52:170-179.
- 48.- Sawynock, J. (1987). GABAergic mechanisms of analgesia: An update. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26:463-474.
- 49.- Paredes, R.G. y Agmo, Å. (1992). GABA and Behavior: The Role of receptor Subtypes. *Neurosci. and Biobehav. Rev.* 16:145-170.
- 50.- Thaker, G. K. ; Tamminga, C.A. ; Alphas, L.D. ; Lafferman, J. ; Ferraro, T.N. y Hare, T.A. (1987). Brain  $\gamma$ -aminobutyric acid abnormality in tardive dyskinesia. Reduction in cerebrospinal fluid GABA levels and therapeutic response to GABA agonist treatment. *Arch. Gen. Psych.* 44:522-529.
- 51.- Lloyd, K.G. y Pichat, P. (1987). GABA synapses, depression and antidepressant drugs. In: Dahl, S.G. ; Gram, K. ; Paul, O.P. y Potter, R. eds. *Clinical pharmacology in psychiatry*. Berlin: Springer. p.p.113-125.
- 52.- Uhlhaas, S. ; Lange, H. ; Wappenschmidt, J. y Olek, K. (1986). Free and conjugated CSF and plasma GABA in Huntington's chorea. *Acta Neurol. Scand.* 74:261-265.
- 53.- Chu, D.C. M. ; Penney, J.B. y Young, A.B. (1987). Cortical GABA-A and GABA-B receptors in Alzheimer's disease: A quantitative autoradiographic study. *Neurology* 37: 1454-1459.
- 54.- Owens, F. D. ; Boyce, H.L. ; Davis, E.M.B. y Kriegstein, R.F. (1996). Excitatory GABA Responses in Embryonic and Neonatal Cortical Slices Demonstrated by Gramicidin Perforated-Patch Recordings and Calcium Imaging. *J. of Neurosci.* 16:6414-6423.

- 55.- McGeer, P.L. y McGeer, E.G. (1989). "Basic Neurochemistry" 4ta. Ed. (Siegel, G. ; Agranoff, B. ; Albers, R.W. y Molinoff, eds.) Raven Press, New York, p.p.311-332.
- 56.- Hayashi, T. (1952). A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn. J. Pharmacol.* 3:46.
- 57.- Hayashi, T. (1958). Inhibition and excitation due to  $\gamma$ -aminobutyric acid in the central nervous system. *Nature.* 182:1076.
- 58.- Streit, P. (1985). En : *Cerebral cortex* (Eds. Jones, E.G. y Peters, A.) Plenum Press, New York. p.p.340.
- 59.- Guiffrida, R. y Rustioni, A. (1989). Glutamate and aspartate immunoreactivity in cortico-cortical neurons of the sensorimotor cortex of rats. *Exp. Brain Res.* 74:41-46.
- 60.- McGeer, P.L. ; McGeer, E.G. ; Scherer, U. y Singh, K. (1977). A glutamatergic corticostriatal path?. *Brain Res.* 128:369-373.
- 61.- Carroll, E.W. y Wong-Riley, M. (1987). Neuronal uptake and laminar distribution of tritiated aspartate, glutamate, gamma-aminobutyrate and glycine in the prestriate cortex of squirrel monkeys: correlation with levels of cytochrome oxidase activity and their uptake in area 17. *Neurosci.* 32:395-412.
- 62.- Storm, M.J., Iversen, L.L. (1979). Uptake, of [3H] glutamic acid in excitatory nerve endings: light-and electron-microscopic observations in the hippocampal formation of the rat. *Neurosci.* 4:1237-1255.
- 63.- Terrian, D.M. ; Johnston, D. ; Claiborne, B.J. ; Ansah, Y.R. ; Strittmatter, W.J. y Rea, M.A. (1988). *Brain Res. Bull.* 27:343-351.

- 64.- Watkins, J.C. y Evans, R.H. (1981). "Excitatory amino acid transmitters". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21:165-204.
- 65.- Reubi, J.C. (1980). Comparative study of the release of glutamate and GABA newly synthesized from glutamine in various regions on the central nervous system. *Neurosci.* 5:2145-2150.
- 66.- Ward, H.K. ; Thenki, C.M. y Bradford, H.F. (1983). Glutamine and glucose as precursors of the transmitter amino acids: ex vivo studies. *J. Neurochem.* 40:855-860.
- 67.- Fonnum, F. (1984). "Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain". *J. Neurochem.* 42:1-11.
- 68.- Stuart, A.L. y Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Eng. J. of Med.* 30:613-622.
- 69.- Monaghan, D.T. (1993). Autoradiographic analysis of excitatory amino acid receptors. In: *Receptor autoradiography: principles and practice* (Wharton, J. y Polak, J.M., eds.). London: Oxford UP.
- 70.- Wisden, W. Y Seeburg, P.H. (1993a). Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3:291-298.
- 71.- John, D.A. y Mayer, L.M. (1995). Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5:310-317.
- 72.- Molinoff, B.P. ; Williams, K. ; Pritchett, B. D. y Zhong, J. (1994). Molecular pharmacology of NMDA receptors: modulatory role of NR2 subunits. *Prog. Brain Res.* 100:39-45.
- 73.- Huntley, W.G. ; Vickers, C.J. y Morrison, H.J. (1994). Cellular and synaptic localization of NMDA and non-NMDA receptor subunits in the neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease. *TINS.* 17:536-543.

- 74.- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of nervous system. *Neuron*. 1:623-634.
- 75.- Engelsen, B. (1986). Neurotransmitter glutamate: its clinical importance. *Acta. Neurol. Scand.* 74:337-355.
- 76.- McDonald, J. W. y Johnston, M. V. (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15:41-70.
- 77.- Mattson, M.P. (1988). Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain Res. Rev.* 13:179-212.
- 78.- Insel, T.R. ; Miller, L.P. y Gelhard, R.E. (1990). The ontogeny of excitatory amino acids receptors in rat forebrain I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neurosci.* 35:45-52.
- 79.- Scheetz, A.J. y Constantine-Paton, M. (1994). Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neuronal development. *FASEB J.* 8:745-752.
- 80.- Komuro, H. y Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 260:95-97.
- 81.- Lucas, D.R. y Newhouse, J.P. (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.* 58:193.
- 82.- Olney, J.W. (1979). *Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology.* Raven, New York p.p. 287.
- 83.- Olney, J.W. and Sharpe, L.G. (1969). Brain lesions in infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science.* 166:386.

- 84.- Steiner, H.X. ; McBean,G.J. ; Kohler,C. ; Roberts,P.J. y Scharez,R. (1984). Ibotenate-induces neuronal degeneration in immature rat brain. *Neurosci. Lett.* 71:13-18.
- 85.- Meldrum, B. y Garthwaite,J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends. Pharmacol. Sci.* 11:379-387.
- 86.- Lipton,S.A. (1992). Models of neuronal injury in AIDS: another role for the NMDA receptor?. *Trends. Neurosci.* 15:75-79.
- 87.- Candy,J.M. y Perry,E.K. (1983). Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 59:277-289.
- 88.- Probst, A. ; Basler,V. ; Gron, E. y Ulrich,J. (1983). Neuritic plaques in senile dementia of the Alzheimer type: a Golgi analysis in the hippocampal region. *Brain Res.* 268:249-254.
- 89.- Beas-Zárate, C. ; Schliebs,R. ; Morales-Villagrán,A. y Feria-Velasco,A. (1989). Monosodium L-glutamate induced convulsions: changes in uptake and release of catecholamines in cerebral cortex and caudate nucleus of adult rats. *Epilepsy Res.* 4:20-27.
- 90.- Ortuño-Sahagún,D. ; Beas-Zárate,C. ; Adame-González,G. y Feria-Velasco,A. (1997). Effect of L-glutamate on cholinergic neurotransmission in various brain regions during the development of rats, when administered perinatally. *Neurochem. Int.* 31:683-692.
- 91.- Beas-Zárate, C. ; Sánchez-Ruiz,M.Y. ; Ureña-Guerrero,M.E y Feria-Velasco,A. (1998). Effect of neonatal exposure to monosodium L-glutamate on regional GABA release during postnatal development. *Neurochem. Int.* 33:217-232.
- 92.- Choi,D.W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7:369.

- 93.- Choi, D.W. (1991). Excitotoxicity. In Excitatory Amino Acid Antagonists (ed. Meldrum B.S), Blackwell Scientific Publications, Oxford. p.p. 216-236.
- 94.- Simon, R. P; Swan, J. H. ; Griffiths, T. y Meldrum, B. S. (1984). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischaemic damage in the brain. *Science*.226:850-852.
- 95.- Wieloch, T. (1985). Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science*.230:681-683.
- 96.- Massieu, L.; Thedinga, K.H.; McVey, M. y Fagg, G.E. (1993). A comparative analysis of the neuroprotective properties of competitive and uncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists *in vivo*: implications for the process of excitotoxic degeneration and its therapy. *Neurosci*. 55:883-892.
- 97.- Huettner, J.E. y Bean, B.P. (1988). Block of N-methyl-D-aspartate activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 85:1307-1311.
- 98.- Hahn, J.S. ; Aizenman, E. y Lipton, S.A. (1988). Central mammalian neurons normally resistant to glutamate toxicity are made sensitive by elevated extracellular calcium: toxicity is blocked by the NMDA antagonist MK-801. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:6556-6560.
- 99.- Olney, J.W. ; Price, M.T. ; Salles, K.S. ; Labruyere, J. y Friedrich, G. (1987). MK-801 powerfully protects against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity. *Eur. J. Pharmacol*. 141:357-361.
- 100.- Goldberg, M.P. ; Vissekul, V. y Choi, D.W. (1988). Phencyclidine receptor ligands attenuate cortical neuronal injury after NMDA exposure or hypoxia. *J. Pharm. Exp. Ther*. 245:1081-1092.
- 101.- Peterson, C. ; Neal, J.H. y Cotman, C.W. (1989). Development of N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Dev. Brain Res*. 48:187-195.

- 102.-Beal,M.F. ; Kowall,N.W. ; Swartz,K.J. ; Ferrante,R.J. y Martin,J.B. (1988). Systemic approaches to modifying quinolinic acid striatal lesions in rats. *J. Neurosci.* 8:3901-3908.
- 103.-Raelyn,J. (1992). Glutamate neurotoxicity in the developing rat cochlea is antagonized by kynurenic acid and MK-801. *Brain Res.* 590:201-206.
- 104.-Beas-Zárate,C. ; Sandoval,M.E. y Feria-Velasco,A. (1984). Serotonin uptake and release from rat cerebellum in vitro. *J. Neurosci. Res.* 12:129-136.
- 105.-Monaghan,D.T. ; Bridges,R.J. y Cotman,C.W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:365-402.
- 106.-Kho,J. ; Goldberg,M.P. ; Hartley,D.M. y Choi,D.W. (1990). Non-NMDA Receptor-Mediated Neurotoxicity in Cortical Culture. *J. Neurosci.* 10:633-645.
- 107.-McDonald,J.W. ; Johnston,M.V. y Young,A.B (1990). Differential ontogenetic development of the three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. *Exp. Neurol.* 110:237-247.
- 108.-Collingridge,G.L. y Lester,R.A.J. (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 41:143-210.
- 109.-Anegawa,N.J. ; Lynch,D.R. ; Verdoorn,T.A. y Pritchett,D.B. (1995). Transfection of N-Methyl-D-Aspartate Receptors in a Non neuronal Cell Line Leds to Cell Death. *J. Neurochem.* 64:2004-2012.
- 110.-Koler,C y Schwarcz, R. (1981). Monosodium glutamate: increased neurotoxicity after removal of neuronal re-uptake sites. *Brain Res.* 211:485-491.

- 111.-Bahn, S. y Wisden, W. (1994). Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J. Neurosci.* 14:5525-5547.
- 112.-Sucher, M. ; Miller, A. y Cohen, J. (1994). Calpain activation in apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 159:229-237.
- 113.-Lo Turco, J.J. ; Blanton, M.G. y Kriegstein, A.R. (1991). Initial expression of endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. *J. Neurosci.* 11:792-799.
- 114.-Cobas, A. ; Fairén, A. ; Alvarez-Bolado, G. y Sánchez, M.P. (1991). Prenatal development of the intrinsic neurons of the rat neocortex: A comparative study of the distribution of GABA-Immunoreactive cells and the GABA<sub>A</sub> receptor. *Neurosci.* 40:375-397.
- 115.-Martin-Padilla, M. (1992). Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: A unifying theory. *J. Comp. Neurol.* 321:223-240.
- 116.-McDonald, J. W. ; Silverstein, F. S. y Johnston, M. V. (1990). MK-801 pretreatment enhances N-methyl-D-aspartate-mediated brain injury and increases brain N-methyl-D-aspartate recognition site binding in rats. *Neurosci.* 38:103-113.
- 117.-Blue, M.E. y Johnston, M.V. (1995). The ontogeny of L-glutamate receptors in the rat barrel field cortex. *Dev. Brain Res.* 84:11-25.
- 118.-Kutsuwada, T. ; Kashiwabuchi, N. ; Mori, H. ; Sakimura, K. ; Araki, K. ; Meguro, H. ; Masaki, H. ; Kumanishi, T. ; Arakawa, M. y Mishina, M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*, 358:18-19.
- 119.-Molinoff, P.B. ; Williams, K. ; Pritchett, D.B y Zhong, J. (1992). Molecular pharmacology of NMDA receptors: modulatory role of NR2 subunits, In: F. Bloom de, *Progress in Brain Research*, p.p.39-45.

- 120.-Monyer,H. ; Burnashev,N. ; Laurie,D.J. ; Sakmann,B. y Seeburg,P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and fuctional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12:529-540.
- 121.-Grimwood, S. ; Le Bourdelles, B. ; Atack, J.R. ; Barton, C. ; Cockett, W. ; Cook,S.M. ; Gilbert,E. ; Huston,P.H. ; McKernan,R.M. ;Myers,J. ; Ragan,C.I. ; Wingrove,P.B. y Whiting,P.J. ( 1996a). Generation and characterisation of stable cell lines expressing recombinant human N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J. Neurochem.* 66:2239-2247.
- 122.-Grant, E.R. ; Baeskai, B.J. ; Pleasure, D.E. ; Pritchett, D.B. ; Gallagher, M.J. ; Kendrick,S.J. ; Kricka.L.J. y Lynch,D.R. (1997). N-methyl-D-aspartate receptors expressed in a non-neuronal cell line mediate subunit-specific increases in free intracellular calcium. *J.Biol.Chem.* 272:647-656.
- 123.-Michaleis,E.K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurol.* 54:369-415.
- 124.-Frandsen, A. ; Drejer, J. y Schousboe, A. (1989). Direct evidence that excitotoxicity in cultured neurons is mediated via N-methyl-D-aspartate (NMDA) as well as non-NMDA receptors. *Brain Res. Rev.* 53:297-299.
- 125.-Pasantes, H. ; Sánchez, J. y Tapia, R. (1991). *Neurobiología Celular*, FCE, México,p.p. 308-323.
- 126.-Sivilotti, L. y Nistri, A. (1991). GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 36:35-92.
- 127.-Ben-Ari,Y. ; Cherubini,E. ; Corradetti,R. y Gaiarsa,J.L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurons, *J. Physiol.* 416:303-325.

- 128.-Prasad,A. y Barker,J.L. (1990). Functional GABA<sub>A</sub> receptors are a critical for survival and process outgrowth of embryonic chick spinal cord cells. Soc.Neurosci.Abstr. 16:647.
- 129.-Gaiarsa, J.L. ; Corradetti, R. ; Ben-Ari, Y. Y Cherubini, E. (1991). Control of GABA release by glutamate agonists in neonatal hippocampal neurons. In H.V. Wheal and A.M. Thomson (Eds). Excitatory Amino Acids and Synaptic Function. Academic Press. London. p.p.357-386.
- 130.-Kater,S.B. ; Mattson,M.P. ; Cohan,C. y Connor,J. (1988). Calcium regulation of the neuronal growth cone. TINS. 11:315-321.
- 131.-Horn,T. ;Bauce,L. ; Landgraf,R. y Pittman,Q.J. (1995). Microdialysis with high NaCl causes central release of amino acids and dopamine. J. Neurochem. 64:1632-1644.
- 132.-Burg, M.B. ; Kwon, E.D. y Kültz, D. (1996). Osmotic regulation of gene expression. FASEB J. 10:1598-1606.
- 133.-Walz,W. Y Allen,A.F. (1987). Evaluation of the osmoregulatory function of taurine in brain cells. Exp. Brain Res. 68:290-298.
- 134.-Chan, P.H. y Fishman, R.A. (1977). Effects of hyperosmolarity on release of neurotransmitter amino acids from rat brain slices. J.Neurochem. 29:179-181.
- 135.-Neumann,L. ; Ludwig,M. ; Engelmann,M. ; Pitmann,Q.J. y Landgraf,R. (1993). Simultaneous microdialysis in blood and brain:oxytocin and vasopressin release in response to central and peripheral osmotic stimulation and suckling in the rat. Neuroendocrinology. 58:637-345.