

178
2e3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MEDICION DE
ACIDO γ -AMINOBUTIRICO (GABA)
EN EL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO
DE PACIENTES CON ENFERMEDADES
NEUROLOGICAS

TRABAJO DE TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BILOGO

PRESENTA

ALEJANDRO TREJO ZEPEDA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARZO DE 1993



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

1-	INTRODUCCION.....	1
	A) El GABA como neurotransmisor.....	5
	B) Metabolismo del GABA.....	7
	C) Liberación del GABA.....	9
	D) Efectos postsinápticos del GABA.....	11
	E) Inactivación del GABA.....	15
	F) Farmacología del GABA.....	17
	G) Distribución anatómica del GABA.....	19
	H) El Líquido Cefalorraquídeo (LCR).....	22
	I) El GABA en el Líquido Cefalorraquídeo.....	26
	J) Las neuronas GABAérgicas y la patología del SNC.....	27
2-	OBJETIVOS.....	31
3-	MATERIALES Y METODOS.....	32
	A) Obtención del líquido cefalorraquídeo.....	32
	B) Medición del GABA.....	33
	C) Obtención de membranas sinápticas.....	34
	D) Ensayo del GABA.....	35
	E) Evaluación estadística de los resultados.....	36
	F) Materiales.....	36
4-	RESULTADOS.....	37
	A) Epilepsia.....	41
	B) Cisticercosis.....	43
	C) Otras enfermedades.....	44

5-	DISCUSION.....	46
	A) Valores control.....	49
	B) Epliepsia.....	52
	C) Cisticercosis.....	53
	D) Otros padecimientos.....	54
6-	CONCLUSIONES.....	56
7-	REFERENCIAS.....	58

INTRODUCCION.

El cerebro es un tejido compuesto por células especializadas denominadas neuronas, que tienen una forma celular característica, una membrana externa capaz de generar impulsos eléctricos y que al interactuar con otras neuronas dan lugar a una estructura única : la sinapsis. Mas aún las neuronas están rodeadas, sostenidas e influidas metabólicamente por las llamadas células gliales.

Una neurona típica consta de un cuerpo celular que tiene de 5-100 μm de diámetro del que emanan una fibra principal llamada axón y varias ramas fibrosas denominadas dendritas. En términos muy generales las dendritas reciben información, el cuerpo celular la integra y el axón la transmite, vía numerosas ramificaciones a un nuevo conjunto de neuronas.

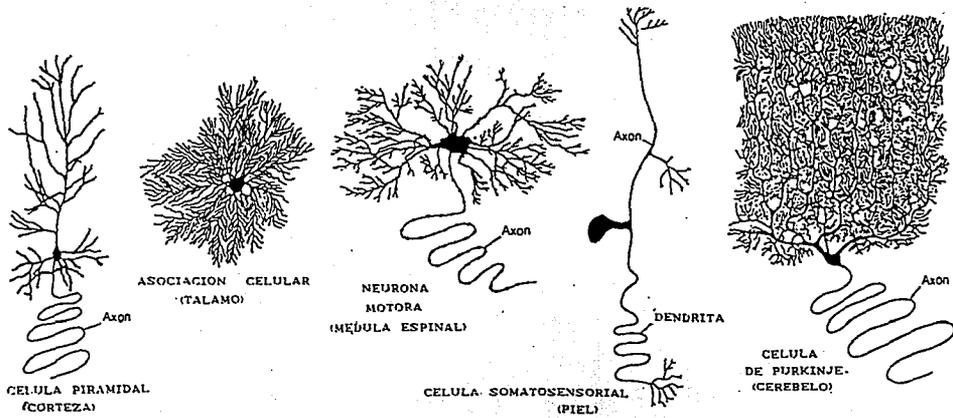
Los mecanismos de acción del cerebro en sus diferentes facetas dependen del flujo de información a través de elaborados circuitos consistentes en redes neuronales ; en ellas la información pasa de una célula a otra mediante sitios de contacto especializados denominados sinapsis : los mensajes emitidos por las células nerviosas pueden ser clasificados como químicos y eléctricos.

Las sinapsis químicas vastamente mayoritarias están caracterizadas morfológicamente por una terminal nerviosa presináptica, un espacio intersináptico y una terminal postsináptica. El tipo de sinapsis más común es el que se establece entre una terminal axónica y una dendrita postsináptica

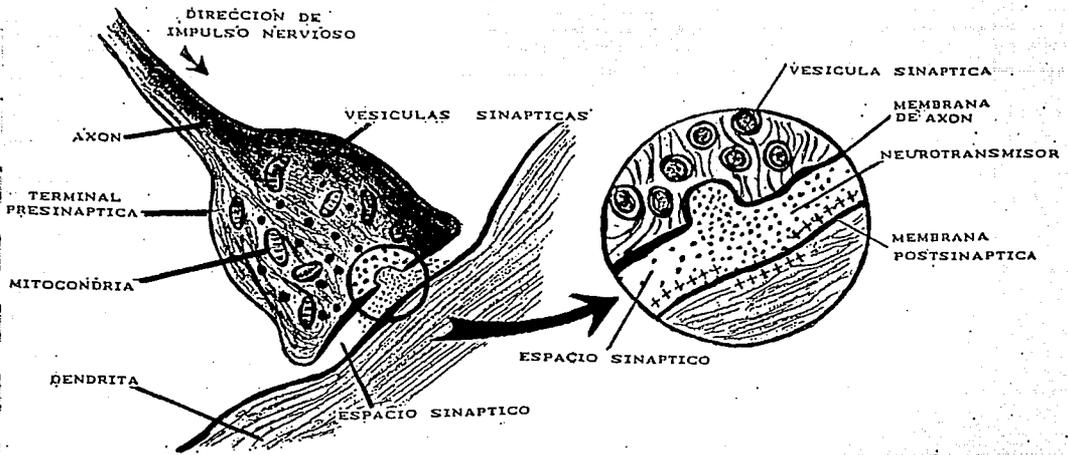
y se denomina axo-dendrítica, pero también existen sinapsis axo-axónicas y axo-somáticas, lo que significa que el soma y el axón también pueden recibir la información. El elemento presináptico es generalmente una terminal nerviosa, sin embargo puede darse el caso de que este sitio esté ocupado por una dendrita o el soma.

Los pasos básicos involucrados en la transmisión química están bien establecidos : Cuando la terminal nerviosa presináptica es despolarizada por la llegada del potencial de acción, los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje se abren, permitiendo que se establezca un flujo de iones Ca^{2+} hacia el interior de la terminal. La entrada de Ca^{2+} activa la liberación del transmisor el cual difunde por el espacio sináptico hacia la membrana postsináptica, en donde se une a proteínas receptoras específicas. Los receptores activados a su vez abren canales que permiten el paso de iones específicos generando así un potencial postsináptico.

Dependiendo del neurotransmisor liberado y del resultado de su interacción con el receptor; la membrana postsináptica podrá variar su potencial de membrana esto es, ser despolarizada o hiperpolarizada dando lugar a la transmisión y propagación de los impulsos en el primer caso (transmisión excitadora) o a su interrupción (transmisión inhibitoria).



ESQUEMA 1- DIVERSIDAD DE FORMAS DE LAS NEURONAS. LOS ELEMENTOS ESTRUCTURALES BASICOS DEL CEREBRO. (MODIFICADO DE KOLB Y WHISHAW 1990)¹



ESQUEMA. 2- COMPONENTES ESTRUCTURALES DE UNA SINAPSIS QUÍMICA.
(MODIFICADO DE HOLE 1990)²

Aunque en la actualidad existe una considerable confusión sobre la coexistencia y coliberación de varios neurotransmisores de una misma sinapsis, clásicamente se considera que en las sinapsis excitadoras el neurotransmisor liberado es la acetilcolina o el ácido aspártico y/o glutámico o algunos neuropéptidos en tanto que en las sinapsis inhibitoras se ha propuesto una gran variedad de neurotransmisores a ser liberados, tal diversidad incluye aminoácidos como el ácido γ -Aminobutírico (GABA) o la glicina ; aminas como las catecolaminas o las indolaminas y una gran diversidad de neuropéptidos.

EL GABA COMO NEUROTRANSMISOR

El GABA fue considerado por muchos años como un intermediario del metabolismo de microorganismos y de plantas; y fue hasta la década de los 50' cuando Roberts y Awapara en forma independiente descubren que este aminoácido estaba presente en el cerebro de mamíferos y sugieren un papel importante en su funcionamiento. (3,4)

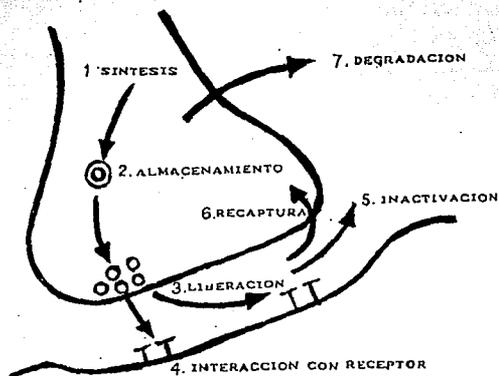
En la actualidad y en base a los criterios propuestos por Werman en 1966 se considera al GABA como un neurotransmisor inhibitorio :

- 1) Se encuentra presente en terminales nerviosas en donde puede estar almacenado dentro de vesículas sinápticas. (5,6)
- 2) Existe un mecanismo de síntesis y degradación enzimática catalizado por la descarboxilasa glutámica (GAD) y la GABA-amino-transferasa (GABA-T) respectivamente.
- 3) Se ha identificado un mecanismo de inactivación que consiste en la captura del aminoácido por la misma terminal sináptica que lo libera. También se han propuesto mecanismos similares por las células gliales o las neuronas postsinápticas (7,8)
- 4) Cuando se aplica iontoforéticamente en neuronas de diversas regiones del sistema nervioso, provoca cambios eléctricos en la membrana de estas células que son idénticos a los que causa la liberación del transmisor natural por estimulación eléctrica. (9)
- 5) Existen sustancias que aplicadas iontoforéticamente, bloquean específicamente los cambios de potencial en la membrana

específicamente los cambios de potencial * en la membrana postsináptica producidos por el GABA o por la estimulación eléctrica. (10)

6) Se ha demostrado su liberación espontánea de terminales sinápticas, y un aumento de esta liberación por estimulación eléctrica o despolarización con altas concentraciones de K^+ en presencia de Ca^{2+} . (11,12)

7) Tanto la actividad de la GAD como la concentración de GABA disminuyen en las terminales sinápticas cuando se produce experimentalmente una degeneración de vías que neurofisiológicamente se comportan como GABAérgicas (13)



ESQUEMA 3- EVENTOS CRUCIALES QUE DEBE CUMPLIR UN NEUROTRANSMISOR PARA SER CONSIDERADO COMO TAL Y A QUE NIVEL SE LLEVA A CABO CADA EVENTO. (MODIFICADO DE KOLB Y WHISHAW 1990) ¹

METABOLISMO DEL GABA

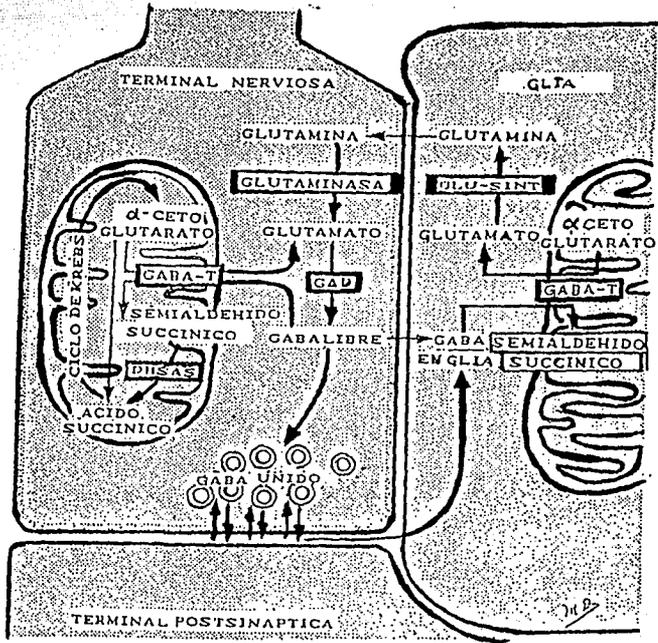
La síntesis de GABA se diferencia de la de otros neurotransmisores por no ser una vía multienzimática; en ella se requiere de un solo paso en el cual la glutamato descarboxilasa (GAD),⁽¹⁴⁾ cataliza la descarboxilación del ácido glutámico produciendo directamente el GABA y CO₂.

La GAD utiliza al fosfato de piridoxal (PALP), como coenzima. Esto último es de vital importancia ya que la síntesis de GABA se regula directamente por la actividad de la GAD y está a su vez depende de la concentración de PALP libre.^(15,16) La enzima esta presente en el cerebro predominantemente como apoenzima (enzima inactiva que no esta unida al fosfato de piridoxal).

La GAD ha sido purificada del cerebro de varias especies de mamíferos incluyendo al hombre^(17,18,19,20) y está localizada en el sinaptoplasma de las terminales nerviosas obtenidas de homogeneizados de cerebro.⁽⁶⁾ Los estudios cinéticos de la GAD han demostrado que existen dos formas diferentes de actividad enzimática; una que depende de la coenzima firmemente unida a la apoenzima y que por consiguiente es independiente del PALP y otra que depende del PALP libre.^(15,21)

Por otro lado el sistema enzimático encargado de llevar a cabo el catabolismo del GABA se encuentra en las mitocondrias⁽⁶⁾ y está estrechamente vinculado con el ciclo de Krebs. La GABA-T, que es también dependiente de PALP,⁽²²⁾ cataliza la transferencia del

grupo amino del GABA al ácido α -cetoglutarico dando como productos el semialdehído succínico y el ácido glutámico. El semialdehído succínico es posteriormente oxidado a ácido succínico por la acción de la deshidrogenasa del semialdehído succínico, que requiere a su vez NAD como coenzima.



ESQUEMA 4- METABOLISMO DEL GABA Y RELACION NEURONA-GLIA. DENTRO DE LAS TERMINALES NERVIOSAS EL GABA ES SINTETIZADO POR ACCION DE LA GAD Y METABOLIZADO POR LA GABA-T MITOCONDRIAL Y LA DESHIDROGENASA DEL SEMIALDEHIDO SUCCINICO (DHSAS) A ACIDO SUCCINICO QUE SE INCORPORARA AL CICLO DE KREBS PARA SU POSTERIOR METABOLISMO. SE CONSIDERA QUE EL GLUTAMATO PRECURSOR DEL GABA PROVIENE DE LA GLUTAMINA PROPORCIONADA DE LA TERMINAL NERVIOSA POR LA GLIA EN DONDE A SU VEZ ES SINTETIZADA POR LA GLUTAMINO-SINTETASA (GLU-SIN) A PARTIR DE GLUTAMATO PRODUCIDO COMO COSECUENCIA DEL CATABOLISMO DEL GABA. ASI EL GABA PRODUCIDO EN LA TERMINAL NERVIOSA ES LIBERADO E INACTIVADO POR LAS CELULAS GLIALES QUIENES PRODUCEN GLUTAMINA QUE SIRVE DE PRECURSOR AL GABA DENTRO DE LA NEURONA. ESTABLECIENDO ASI UN CICLO METABOLICO ENTRE LA NEURONA Y LA GLIA (MODIFICADO DE MCGGER, ECCLES, Y MCGGER 1987) ²³

LIBERACION DEL GABA.

Para ejercer su acción biológica un neurotransmisor debe ser liberado de su sitio de almacenamiento en las terminales nerviosas presinápticas y debe interactuar con receptores específicos localizados postsinápticamente. Los neurotransmisores no son liberados al azar sino que su secreción obedece a señales específicas que recibe la célula. El estímulo para la liberación del neurotransmisor es la despolarización de la terminal presináptica; que se produce ya sea por un impulso nervioso o por la aplicación artificial de corriente eléctrica. Para que la liberación ocurra deben existir en el medio iones Ca^{2+} en el momento de la despolarización; pues al entrar el Ca^{2+} a la terminal, ésta se activa y se produce la liberación del neurotransmisor. (24)

Los métodos ideados para estudiar la liberación del GABA se han aplicado tanto in vitro como in vivo. (25,26) In vitro se han usado rebanadas de cerebro, sinaptosomas o células en cultivo perfundidas con un medio adecuado que incluye, además de una composición iónica definida la presencia de agentes despolarizantes tales como la veratridina (27) o concentraciones elevadas de K. In vivo se han colocado pequeñas "tazas" sobre la superficie cerebral, cánulas "push-pull" localizadas en áreas específicas del cerebro o incluso microdialisis de diversas zonas cerebrales. (28,29,30)

La liberación del GABA desde las terminales nerviosas es un evento crucial en su acción reguladora de la actividad neuronal ; el mecanismo de su liberación es aún tema de controversia ya que aunque de manera análoga a la de otros neurotransmisores el Ca^{2+} parece tener un papel fundamental en este proceso, ⁽³¹⁾ existen evidencias de que su liberación es sólo parcialmente dependiente de este ión. ⁽³²⁾ Mas aún el sitio de su liberación es discutido pues en tanto que algunos defienden su liberación vesicular otros apoyan su liberación citosólica. ^(33,34)

La liberación de GABA, es influenciada por diversos fármacos que actúan sobre el SNC. De este modo la liberación de GABA puede ser incrementada o inhibida y esto depende del fármaco aplicado, de su concentración, o del método de estudio, así a manera de ejemplo puede decirse que la liberación de GABA se ve disminuida cuando la actividad de la GAD se inhibe. ⁽²⁹⁾ Asimismo el Pentobarbital podría inhibir la liberación de GABA a través de modificaciones en el mecanismo de transporte de Ca^{2+} ⁽³⁵⁾ y el Diazepam puede estimular o inhibir esta liberación dependiendo de la concentración usada. ⁽³⁶⁾ Dado que tanto el baclofen como el muscimol actúan sobre receptores GABAérgicos resulta de particular importancia el efecto inhibitorio de estas drogas sobre la liberación de GABA, en vista de que tales efectos pudieran estar mediados por la activación de autoreceptores GABAérgicos presinápticos. ^(37,38)

EFFECTOS POSTSINAPTICOS DEL GABA

La activación de los receptores GABAérgicos es responsable de la clásica inhibición postsináptica. Diversos estudios han caracterizado la unión del GABA a dos tipos de receptores denominados GABA_A y GABA_B que presentan diferencias estructurales y en su distribución anatómica, así como de acciones fisiológicas, farmacológicas, y cinéticas. (29,40)

Desde el punto de vista farmacológico el primero de estos receptores el GABA_A es sensible a la bicuculina e insensible al baclofen mientras que el GABA_B es insensible a la bicuculina y sensible al baclofen. Mas aún se ha demostrado estereoselectividad en estos efectos pues sólo el (-)baclofen es activo. Desde el punto de vista cinético el GABA se une a sus receptores con una gran afinidad ($K_d = 10$ nM para sitios de alta afinidad y una $K_d = 100$ nM para sitios de baja afinidad). Esta unión es independiente del Na presente en el medio y de la temperatura y es aumentada sometiendo membranas postsinápticas a ciclos de congelación y descongelación o exponiéndolas a la acción de detergentes no iónicos del tipo del Tritón X-100.

La distribución anatómica de los receptores GABAérgicos se ha estudiado al evaluar la unión del GABA o de drogas agonistas y/o antagonistas radioactivos a diversos tipos de preparaciones. Los receptores GABA_A presentan sitios de unión de alta y baja afinidad y se encuentran localizados principalmente, por lo que a los

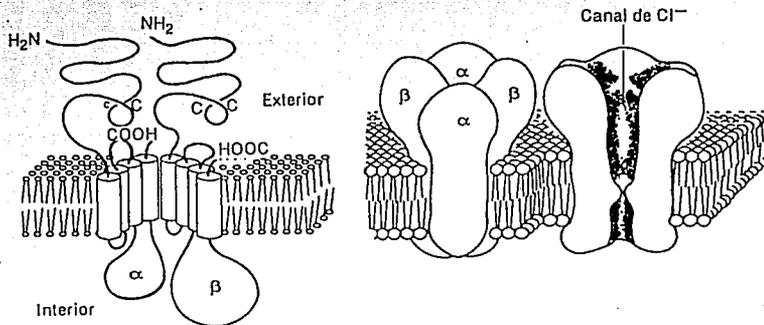
sitios de alta afinidad toca, en el tálamo, (especialmente en el núcleo geniculado medio y lateral), y en la capa granular de el cerebelo. ⁽⁴¹⁾ En contraste los sitios de baja afinidad están más concentrados en la capa IV de la corteza cerebral, en la corteza del cíngulo, en la región hipocámpal (CA1 y en la capa molecular de el giro dentado), en la amígdala anterior, en el hipotálamo medio, en el colículo superior, en la sustancia nigra y en la capa molecular de el cerebelo. ⁽⁴¹⁾ Por otra parte los receptores GABA_B se encuentran en cambio concentrados en el núcleo interpeduncular, en el colículo superior y en la capa molecular de el cerebelo así como en el tálamo. ⁽⁴¹⁾ Además ambos receptores comparten una distribución en la superficie laminar de la corteza cerebral (capas 1-3). ⁽⁴¹⁾

Desde el punto de vista fisiológico la activación de los receptores GABA_A por el GABA u otros agonistas, por ejemplo, muscimol, incrementan la permeabilidad membranal a iones Cl⁻, mientras que los antagonistas como la bicuculina o la picrotoxina bloquean o reducen esta conductancia. Así, la bicuculina reduce la conductancia de el Cl⁻ al competir con el GABA por su sitio de reconocimiento sobre el receptor ; la picrotoxina en cambio actúa directamente sobre los canales de Cl⁻ promoviendo su cierre. ^(42,43)

Por otro lado la activación del receptor GABA_B produce una disminución de la liberación de GABA y otros neurotransmisores mediada probablemente por un bloqueo de los canales de Ca²⁺ dicho

receptor parece caracterizarse por no estar ligado a canales de Cl^- , pero si acoplado a canales de Ca^{2+} y de K^+ ; ya que tanto el baclofen como el GABA disminuyen la amplitud de corriente del Ca^{2+} e incrementan la conductancia del K^+ .⁽³⁸⁾

Recientemente el receptor GABAérgico _A se ha sido aislado y se ha determinado su estructura. Se ha observado que consta de 2 subunidades α y 2 β . Las subunidades incluyen regiones helicoidales que abarcan todo el grosor de la membrana; formando probablemente el canal para los iones Cl^- . La subunidad β posee el sitio de reconocimiento para el GABA en tanto la subunidad α contiene el sitio de reconocimiento para las benzodiazepinas.^(44,45)



ESQUEMA 5- ESTRUCTURA DEL RECEPTOR GABAÉRGICO TIPO "A". NOTESE QUE EL RECEPTOR ES UN TETRAMÉRO CONSTITUIDO POR 2 SUBUNIDADES DE TIPO α Y DOS SUBUNIDADES TIPO β QUE SE ARREGLAN DE TAL MANERA QUE PRODUCEN UN CANAL PARA EL IÓN CLORO. (MODIFICADO DE PASANTES, TAPIA Y SANCHEZ 1990)⁴⁶

Los estudios sobre la activación de ambos receptores al GABA demuestran que esto produce una inhibición neuronal y esta acción puede ser mediada tanto pre o postsinápticamente. (29) La inhibición postsináptica mediada por el receptor GABA_A ocurre cuando el GABA o un agonista apropiado se une a un receptor postsináptico, lo que determina la apertura de canales para Cl⁻. El flujo de entrada de este ión a la célula hiperpolariza su membrana inhibiendo de este modo la acción de la neurona. La inhibición presináptica mediada también por el GABA_A ocurre a través de la liberación de GABA por el axón de una neurona y que depolariza ligeramente al axón de una segunda célula. Tal efecto evita que una acción despolarizante posterior sea capaz de liberar neurotransmisores del axón afectado por la neurona GABAérgica.

La inhibición postsináptica mediada por el receptor GABA_B se lleva a cabo a través de un mecanismo diferente, ya que no esta asociada directamente a algun canal iónico mas bien es de tipo metabotropico ; su acción final es la apertura de canales de K⁺ y la salida de este ión resulta en la hiperpolarización de la célula. Otro posible mecanismo de funcionamiento de este receptor es el cierre de canales de Ca²⁺ (47) El mecanismo de inhibición presináptica que incluye la participación del receptor a GABA_B es mas simple ya que estos receptores parecen estar localizados sobre las terminales nerviosas presinápticas y su activación reduce la conductancia de Ca²⁺(48) de modo que al penetrar menos Ca²⁺ hay un decremento en la liberación del neurotransmisor.

INACTIVACION DEL GABA

La recaptura a nivel presináptico del neurotransmisor liberado al espacio sináptico por las terminales nerviosas, se considera generalmente como un mecanismo de gran efectividad para su inactivación. El GABA junto con otros aminoácidos neurotransmisores se inactiva a través de este mecanismo ; así, después de que el GABA ha sido liberado y ha actuado sobre sus receptores difunde hacia las células gliales y hacia las terminales presinápticas en donde es recapturado y metabolizado.

Se han llevado a cabo una gran variedad de estudios sobre la cinética de captación del GABA en preparaciones tales como sinaptosomas, rebanadas de cerebro y cultivo de células de tejido nervioso. Estos estudios han mostrado que para el caso del GABA la recaptura es un mecanismo con una K_m de 10-40 μM , y con altos requerimientos de Na^+ y de Cl^- . Además dicho mecanismo presenta dependencia de la temperatura, y se considera que la energía para el transporte es obtenida por el gradiente de concentración de Na^+ y el gradiente eléctrico de la membrana por lo que se requieren 2 iones de Na^+ para el transporte de una molécula de GABA. (49)

Aunque como se ha señalado existe la GABA-T capaz de metabolizar al GABA y en principio capaz de inactivar a este aminoácido, su localización intracelular les impide actuar con eficacia en la inactivación de este neurotransmisor.

FARMACOLOGIA DEL GABA

El sistema GABAérgico es afectado por drogas a diversos niveles como son los sitios de su síntesis, de su almacenamiento, de su liberación, de su recaptura o de destrucción ; muchos de estos agentes son altamente inespecíficos, otros son sumamente tóxicos, y aún existen aquellos que no logran atravesar la barrera hematoencefálica.

Las concentraciones de GABA pueden afectarse por una amplia variedad de agentes que actúan sobre las enzimas responsables de su metabolismo (la GAD y la GABA-T) pues ambas presentan dependencia por el mismo cofactor que es el fosfato de piridoxal (PALP), estas drogas pueden actuar en contra del cofactor o de la apoenzima. Así la inhibición de la actividad de las enzimas puede ocurrir como consecuencia de un decremento en la concentración de PALP a través de la inhibición de la cinasa de piridoxal ; por grupos que atrapan el grupo carbonilo del PALP o por dietas deficientes en vitamina B₆. Entre las drogas que pueden realizar esta acción se encuentran las hidrazidas, las hidrazinas, o análogos del PALP, otras drogas tales como el ácido mercaptopropiónico, la alilglicina, el ácido aminooxiacético y la alta presión de oxígeno, inhiben también a la GAD. Además la etanolamina O-sulfato, el ácido valproico, el γ -vinil-GABA, o el γ -acetilen-GABA o la bicuculina inhiben principalmente a la GABA-T.

Cabe mencionar aquí que un decremento en la actividad de la GAD produce una disminución en la concentración de GABA en tanto que el mismo efecto sobre la GABA-T incrementa los niveles del aminoácido. (50,51)

Otra manera de aumentar y prolongar la acción GABAérgica es evitar la recaptura del GABA a nivel del espacio sináptico, que como ya se indicó este se considera el principal mecanismo de su inactivación. La recaptura a nivel neuronal se inhibe por el ácido nipecótico en tanto que la captación a nivel glial que es cientos de veces mas efectiva se afecta por la β -Alanina. (52)

A nivel postsináptico las sustancias GABAérgicas pueden ser divididas en compuestos que estimulan al receptor a GABA directamente o en aquellas que indirectamente causan una activación de dicho receptor. (53) Agentes miméticos del GABA tales como el muscimol y la isoguvacina interactúan directamente con los receptores al neurotransmisor. La acción indirecta se lograría al incrementar la concentración de GABA endógeno, (inhibición de la GABA-T) el cual al difundir de la terminal sináptica alcanzaría al receptor o bien por alterar de alguna manera el acoplamiento del receptor al GABA.

La picrotoxina y la bicuculina son referidos, en cambio, como potentes y específicos bloqueadores del receptor GABAérgico, ya que ambos disminuyen la permeabilidad de la membrana a los iones Cl^- . A su vez fármacos como el Diazepam, el Clonazepam, y el Nitrazepam que pertenecen al grupo de las benzodiazepinas (BZD),

potencian el efecto inhibitor del GABA liberado ya que incrementan la frecuencia de apertura de los canales de Cl^- ; en tanto que los barbitúricos actúan por prolongar el estado de apertura de estos canales. (54)

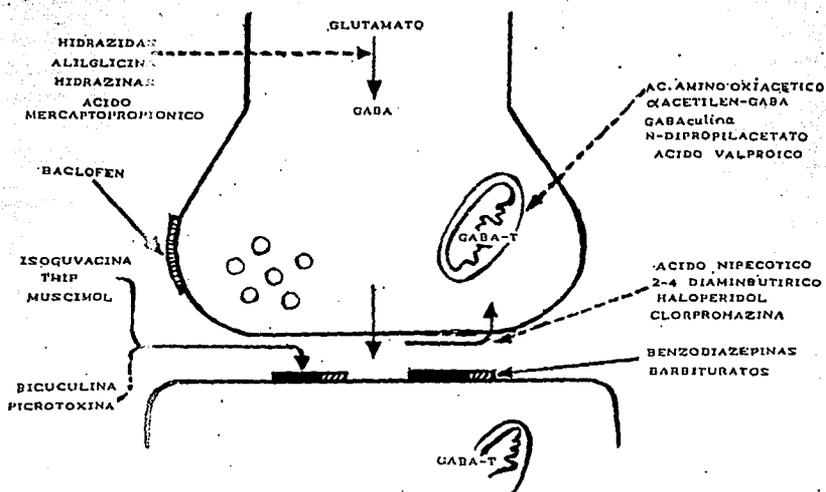


FIG. 6- FARMACOLOGIA DEL GABA Y SITIO DE ACCION DE CADA FARMACO
(MODIFICADO DE PASANTES, TAPIA Y SANCHEZ 1990)⁹⁶

DISTRIBUCION ANATOMICA DEL GABA

El establecimiento de la localización y distribución de las fibras nerviosas y las diversas vías de proyección de un neurotransmisor es de gran ayuda para esclarecer su papel fisiológico.

Para el caso del GABA, que es uno de los neurotransmisores con mas amplia distribución en el SNC, (con concentraciones que van desde el orden de $\mu\text{moles/gr}$) mediante el uso de técnicas que involucran su medición directa o la de la actividad de la GAD o bien gracias a la demostración inmunohistoquímica de estos dos marcadores ha sido posible estudiar la localización y distribución de las neuronas GABAérgicas en el sistema nervioso central de diversas especies de mamíferos.^(55,56) Así, se ha observado que las neuronas GABAérgicas y las diversas vías neuronales que lo involucran muestran una amplia distribución anatómica en el cerebro de diversas especies entre las que se incluye la rata, el mono y el hombre, encontrandose las concentraciones mas altas de este aminoácido o de la GAD en regiones tales como : el globus pallidus, la sustancia nigra, pars reticulada, el hipotálamo, el núcleo dentado y el colículo superior. Concentraciones intermedias de estos marcadores se presentan en el núcleo caudado, o el tálamo ; en tanto que niveles bajos de GABA y/o GAD se tienen en la médula espinal, el puente, y a nivel de la corteza cerebelar. Ha sido posible asimismo describir la existencia tanto de sistemas

GABAérgicos locales constituidos por interneuronas de axón corto en prácticamente todas las regiones estudiadas así como poner en evidencia vías GABAérgicas de proyección tales como la constituida por las proyecciones de las células de Purkinje a el núcleo dentado, la vía caudado-nigral o la nigro-talámica. (41)

Resulta muy importante señalar que a través de la comparación del patrón de distribución y la localización celular de neurotransmisores y neuropéptidos se ha puesto de manifiesto que en muchos casos un transmisor clásico coexiste junto con otro neurotransmisor del mismo tipo o con un péptido biológicamente activo en ciertas poblaciones de neuronas. La primera evidencia de coexistencia de dos neurotransmisores en la misma neurona fue la de la 5-hidroxitriptamina (5-(TH) con el GABA ; pero a la fecha se ha demostrado la coexistencia de aminoácidos neurotransmisores con otros neurotransmisores de otro tipo como son la histamina, la acetilcolina (ACh), y la glicina. En cambio la presencia de somatostatina en algunas neuronas noradrenérgicas periféricas fue también la primera evidencia de coexistencia de un neurotransmisor clásico con un péptido. En la actualidad se ha reportado adicionalmente la coexistencia de este péptido con el GABA a nivel del tálamo, de la corteza y del hipocampo así como la del GABA con algunos otros neuropéptidos como la galanina (Gal), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la sustancia P en el hipocampo de la rata y en la vía estriato-nigral ; con la colecistoquinina (CCK), a nivel de la corteza cerebral y la formación hipocampal, con el

neuropéptido (NPY) en la corteza cerebral, y con la encefalina (ENK), en la retina del pollo y en el hipotálamo de la rata y en la vía estriato al gobo palido.⁽⁵⁷⁾ Aunque se ha intentado analizar y reconocer el posible significado fisiológico de estas situaciones de coexistencia, tanto por su posible papel funcional como por el hecho de que puedan ser de importancia para las estrategias seguidas en el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos. Los resultados a la fecha a este respecto han sido limitados.

Hay que señalar finalmente que aunque la mayor concentración del GABA y de la GAD se ha reportado en el SNC, se han demostrado también trazas de estos marcadores en algunos tejidos periféricos como son nervio ciático, el nervio esplácnico, los ganglios simpáticos, y en órganos tales como : el hígado, el bazo, el riñón, el corazón, el pancreas, los ovarios y las trompas de Falopio.⁽⁵⁸⁾

Debido a esta amplia distribución no es sorprendente entonces que la neuronas GABAérgicas en el SNC participen virtualmente en la regulación de todas sus funciones. Así se han incrementado las evidencias, que apoyadas en diversos enfoques experimentales, señalan que las neuronas que contienen GABA desempeñan papeles importantes en el desarrollo y regulación de una amplia variedad de funciones del SNC que incluyen a los mecanismos de control cerebral, de la consciencia, de la integración motora, y de la regulación de varios procesos fisiológicos, tales como los

procesos cardiovasculares, y respiratorios, la secreción de hormonas, el control de la actividad retiniana, y la motilidad del colon. (53,54)

EL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (LCR)

El LCR es un medio dinamico en continua formación, permanente circulación y absorción, es un líquido transparente de baja densidad. (50)

Desarrolla diversas funciones tales como : protección del cerebro, amortiguador, estabilizador, es la vía de entrada al encéfalo de algunas hormonas, fármacos y otras sustancias y por su conducto se eliminan productos de desecho del metabolismo neuronal. (50,50)

Este líquido se forma primordialmente en los plexos coroideos los cuales se hallan en las cavidades ventriculares. Existen 2 telas coroidales a) la superior que se encuentra en los ventriculos, laterales con una extensión hacia el techo del tercer ventrículo, y b) la inferior que se localiza en el cuarto ventrículo ; los plexos coroideos estan formados por ovillos capilares rodeados por tejido conjuntivo laxo y recubiertos por epitelio cúbico.

La formación de LCR en los plexos coroideos ocurre de la siguiente forma : primero la sangre que entra es filtrada a través de los capilares coroidales esto, forma un fluido rico en proteínas dentro del estroma coroidal, después de esto los

constituyentes que han sido seleccionados de ese estroma son transportados a través del relativamente semipermeable epitelio coroidal ; de esta manera la producción de LCR parece involucrar tanto mecanismos de filtración capilar así como de secreción activa por el epitelio. (59,60,61,62)

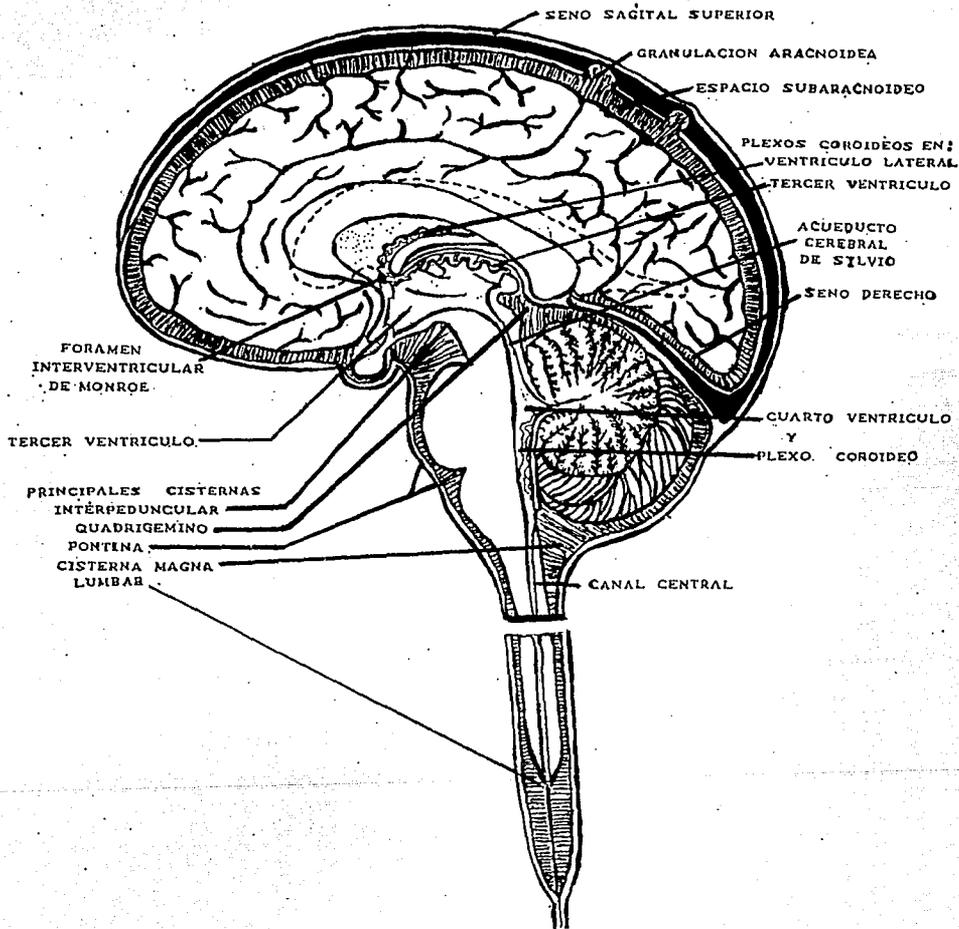
Al LCR se le considera un ultrafiltrado de la sangre ya que guarda gran semejanza con esta en cuanto a la presencia de iones se refiere y a excepción hecha de los niveles de proteína, de la glucosa, en general el LCR presenta mayores concentraciones de Na^+ , Cl^- y Mg^{++} y menores concentraciones de K^+ , y Ca^{++} . (59,60)

De acuerdo a Rapoport la composición del LCR es determinado por diversos factores : (1) metabolismo, producción, captación de solutos por las células del SNC, (2) restricción de difusión intercelular acopladas con mecanismos especiales de transporte en la barrera hematoencefálica, (3) tasa de producción y excreción de LCR por un flujo de volumen. (63,60)

El LCR que se forma en los ventrículos laterales penetra al tercer ventrículo por el foramen interventricular (orificio de Monroe), y fluye a través del acueducto cerebral (acueducto de Sylvio) para llegar al cuarto ventrículo, asimismo alcanza el espacio subaracnoideo (el cual se halla entre la aracnoides y la Pía madre las cuales junto con la duramadre forman las meninges que cubren el cerebro) ; por medio de 3 aperturas : la apertura media, "foramen de Magendie", en el velo medular inferior y en las dos aperturas laterales "forámenes de Luschka " ; ya en el espacio

subaracnoideo el LCR se pone en contacto con la superficie exterior de todo el eje encefalomedular y se reabsorbe en las vellosidades aracnoideas de Pachini de ahí llega finalmente a la sangre venosa del cráneo y se incorpora a la circulación sanguínea general. (60)

La tasa de formación del LCR en el humano es de 0.3 -0.4 ml/mn o 500-600 ml/día, el volumen ventricular es de aprox. 25 ml. con un volumen total de 140 ml. y es renovado el volumen total en 5-7 hrs. (59,60,62)



ESQUEMA 7- EL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (LCR) PRODUCIDO EN LOS PLEXOS COROIDEOS ATRAVIESA EL FORAMEN INTERVENTRICULAR DE MONROE Y LLEGA AL TERCER VENTRICULO DE DONDE SALE HACIA EL CUARTO VENTRICULO VIA EL ACUEDUCTO CEREBRAL DE SILVIO. FINALMENTE EL LCR LLEGA AL ESPACIO SUBARACNOIDEO VIA CANAL CENTRAL MEDULAR Y ES REABSORBIDO POR LAS GRANULACIONES ARACNOIDEAS (MODIFICADO DE MARTIN 1989)

EL GABA EN EL LCR

La medición de neurotransmisores en el LCR ha progresado desde el bioensayo y las técnicas fluorométricas iniciales a los métodos enzimáticos, isotópicos o cromatográficos que se usan en la actualidad. De este modo ha sido posible cuantificar a varias de estas sustancias en áreas discretas del SNC y en líquidos biológicos como el LCR.

De entre los neurotransmisores, el GABA ha podido ser determinado en el LCR tanto de personas sanas como de pacientes afectados por diversos desordenes neurológicos y/o psiquiátricos. Como ocurre con otros neurotransmisores el GABA se halla presente en el LCR en dos formas : libre y conjugado. El GABA libre como su nombre lo indica es aquel que se encuentra como tal en el LCR en tanto que el conjugado es el GABA adicional que aparece después de haber sometido a el LCR a una hidrólisis ácida. Se considera que el GABA conjugado se encuentra en el LCR formando péptidos tales como la Homocarnosina o bien dando lugar por ciclización a la 2-pirrilidinona. No se conoce si el GABA libre y el conjugado dentro del LCR representan entidades químicas en equilibrio. (hay que recordar que la 2-pirrilidinona es la forma cíclica del GABA) o bien entidades químicas independientes. Del GABA total en el LCR el 1-3 % corresponde al GABA libre, un 35 % está constituido por la homocarnosina y algunas otros péptidos y el 53.6 % es atribuido a la 2-pirrilidinona. (65)

Las concentraciones para GABA en LCR de personas normales que se han analizado han mostrado variaciones cuantitativas que van desde 100 pmol/ml hasta 500 pmol/ml para el GABA libre y de 1.5-5.5 nmol/ml para el GABA conjugado; ⁽⁶⁶⁻⁷⁰⁾ la variabilidad encontrada sin duda refleja variables entre las que se incluyen : el procedimiento analítico empleado, las condiciones de colección de la muestra, así como el almacenaje y el manejo de los líquidos entre los problemas técnicos y entre las características de la población a muestrear factores tales como son : la edad, el sexo, la enfermedad y su duración, la terapéutica empleada, y la existencia de ciertos hábitos. ^(71,72)

LAS NEURONAS GABAERGICAS Y LA PATOLOGÍA DEL SNC

El funcionamiento del sistema nervioso está sujeto a un estricto control, es por ello que deficiencias en sus mecanismos reguladores son probablemente responsables de muchos padecimientos neurológicos.

A nivel neuronal las alteraciones en la síntesis, liberación, o inactivación de un transmisor químico determinado, así como las modificaciones en el número y la sensibilidad de los receptores postsinápticos a un transmisor pueden producir perturbaciones sinápticas que pueden ir acompañadas o no de cambios morfológicos característicos. De factores como estos depende la regulación y la estabilidad de la actividad cerebral en los organismos, pues

cambios dinámicos en la actividad de un neurotransmisor, como la presencia de un desequilibrio entre la actividad excitadora e inhibitora podrían verse reflejados o asociados a diversas patologías neurológicas.

De un tiempo a la fecha se ha hecho un gran esfuerzo para identificar los trastornos bioquímicos que pudieran estar involucrados en la etiología y/o fisiopatología de las enfermedades neurológicas y psiquiátricas y como resultado de este trabajo han aparecido evidencias que señalan la participación de tal o cuál neurotransmisor en diversos padecimientos. Así alteraciones en el funcionamiento de las neuronas GABAérgicas se ha involucrado en trastornos tales como la epilepsia, la corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, el alcoholismo, la esquizofrenia, los trastornos de la afectividad o de la angustia entre otras. ⁽⁵⁴⁾

La hipótesis que involucra al GABA en los estados de epilepsia plantea un decremento en la función de las sinapsis GABAérgicas que contribuirían al mantenimiento de un equilibrio normal de excitación-inhibición de manera que cuando surge un exceso de excitación o insuficiencia en la inhibición mediada por estas sinapsis en ciertas regiones clave del cerebro se presentarían las convulsiones. ⁽⁷³⁾ En apoyo de lo anterior se ha observado que cualquier agente farmacológico que reduce la actividad inhibitoria del GABA produce convulsiones. Así la inhibición de la síntesis del GABA (por inhibidores de la GAD) en un 40% o mas provoca

convulsiones en diversas especies animales ; ⁽⁷⁴⁾ del mismo modo las convulsiones se presentan cuando hay fallas a nivel de liberación de este transmisor o por el bloqueo de sus receptores, ⁽⁵⁰⁾ así como también por una reducción en la apertura de los canales de Cl^- que es mediada por este neurotransmisor.

Dentro de este contexto resulta muy interesante que algunos cuadros convulsivos que se presentan en niños se han asociado a una disminución en la síntesis de GABA debida a una deficiencia de piridoxina que al corregirse restaura la síntesis de este neurotransmisor y suprime en forma inmediata las convulsiones. ⁽⁷⁵⁾

En la corea de Huntington y el mal de Parkinson se ha encontrado un decremento en la actividad de la GAD. ^(70,76-79) En forma análoga transtornos psiquiátricos tan difundidos como la esquizofrenia o la psicosis maníaco-depresiva se han asociado a una disminución del tono GABAérgico inhibitorio y a alteraciones consecutivas en la expresión funcional de las neuronas dopaminérgicas localizadas en el tegmento ventral mesencefálico de las que depende la inervación de diversas áreas del sistema límbico. ⁽⁷⁹⁻⁸²⁾ Aunque mucho se ha avanzado en el estudio de la participación de los neurotransmisores en la génesis de las enfermedades neurológicas y psiquiátricas, las restricciones éticas que impiden el análisis directo de los neurotransmisores y/o sus enzimas y receptores en el tejido cerebral de pacientes ha dificultado la tarea, pues se ha tenido en la mayor parte de los casos que recurrir a la medición de cambios en los niveles de

neurotransmisores en el plasma sanguíneo o en el LCR con la idea de que las modificaciones en sus niveles reflejan los cambios que están ocurriendo dentro del parénquima nervioso.

OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS.

En vista de lo señalado en la sección anterior y debido a que existe una considerable controversia con respecto a los niveles de GABA en el LCR de diversos pacientes neurológicos hemos considerado de interés estudiar en forma doble ciego la concentración del GABA tanto libre como conjugado en el líquido cefalorraquídeo en una serie de pacientes pertenecientes al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) afectados por diversas enfermedades neurológicas con la idea de contribuir a establecer la utilidad que los niveles de GABA pudieran tener como instrumento de diagnóstico y/o pronóstico en el ámbito de la neurología clínica.

MATERIALES Y METODOS

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Los LCR utilizados en este trabajo se obtuvieron de 88 pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) afectados de enfermedades diversas. Las muestras se tomaron en el hospital y se analizaron en el laboratorio sin conocer las características clínicas de los pacientes y estos a su vez no fueron seleccionados en base a alguna o algunas patologías particulares. Una vez completadas las mediciones de GABA se procedió a revisar los expedientes clínicos para conocer el desorden neurológico que padecía cada uno de los pacientes estudiados y agruparlos de acuerdo a las enfermedades que los afectaban.

Los desordenes neurológicos en los que fueron agrupados los pacientes incluyen epilepsia, enfermedades cerebro-vasculares, cisticercosis cerebral, esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, a diversos tipos de distonias, a infecciones del tipo de la encefalitis viral, tuberculosis miliar y a algunas otras menos frecuentes.

Dado que por razones éticas no es posible someter a personas normales a las molestias que implica una punción lumbar el grupo control estuvo integrado por pacientes afectados de cefaleas tensionales o de migraña (durante la fase asintomática) en las que no ha sido reportado ningún cambio en la concentración de

GABA.⁽⁸³⁾ En todos aquellos pacientes sujetos a tratamiento medicamentoso los fármacos prescritos fueron retirados desde el día anterior.

EL líquido cefalorraquídeo se obtuvo por punción entre la 3^o y 4^o vertebrae lumbares en pacientes que mantenían una posición de decubito lateral. La muestra obtenida provino en todos los casos de los primeros 3-5 ml obtenidos ; el LCR fue inmediatamente congelado en hielo seco y transportado al laboratorio en donde se almacenó a una temperatura de -70^oC hasta el momento de su análisis. El día del ensayo los líquidos cefalorraquídeos se descongelaron en hielo a una temperatura de 0-4^oC y se desproteínizaron por ebullición (3-4 min). Las proteínas precipitadas fueron eliminadas por centrifugación en frío (1,500g/10 min) y una alícuota del sobrenadante fue usada para la medición del GABA libre. El resto fue nuevamente almacenado a -70^oC hasta su posterior utilización para la medición del GABA total.

medición del GABA

La concentración de GABA fue medida mediante la técnica del radioreceptor descrita originalmente por Enna y Snyder ⁽⁸⁴⁾ con algunas modificaciones. Dicha técnica está basada en la unión de una cantidad conocida de 2-3 [³H] GABA a receptores presentes en preparaciones de membranas sinápticas y a su desplazamiento por el

GABA contenido en la muestra que se analiza. La cantidad de GABA presente en el espécimen analizado se interpola de curvas de desplazamiento en las que se grafica el % de desplazamiento vs el log de diversas concentraciones conocidas de GABA frío usadas como desplazador.

Obtención de membranas sinápticas

Para la obtención de las membranas sinápticas, 10 cerebros de rata se homogeneizaron en un homogenizador Omni-Mixer Sorvall por 45 seg en un medio de sacarosa 0.32 M (9 vol/gr). El homogeneizado se centrifugo a 1,000g/10 min y el sobrenadante se recentrifugo a 20,000g/20 min para obtener la fracción sinaptosomal cruda, a la cual se le aplico un shock osmótico por resuspensión en agua bidestilada (20 vol/gr) y posteriormente se homogenizo durante 45 seg. El material no afectado por el shock osmótico se empaqueto a 8,000g/20 min y el sobrenadante de esta centrifugación junto con el paquete flojo del pellet conteniendo las membranas sinápticas con los receptores al GABA son colectados por centrifugación a 48,000g/20 min y lavados 2 veces mediante su resuspensión en agua y su centrifugación a la misma velocidad. Finalmente el pellet se resuspendio en buffer Tris-HCl 0.1N pH 7.4 (20 vol/gr) e incubado a 37°C por 30 min con Tritón X-100 al 0.05% para desenmascarar receptores ocultos. Al final de dicha incubación las membranas son colectadas por centrifugación bajo las condiciones anteriores y

almacenados a -70°C por un período mínimo de 24 hrs.

Ensayo de GABA

Para la medición del GABA libre presente en los líquidos cefalorraquídeos las membranas sinápticas son descongeladas y resuspendidas en buffer Tris-HCl 0.1N pH 7.4 y tratadas nuevamente con Tritón X-100 como se describió anteriormente. Después de su colección por centrifugación las membranas son resuspendidas en un volumen de buffer suficiente para dar una concentración de proteína de 0.8-1.2 mg/ml. Para el ensayo de GABA en todos los casos se pipeteo en frío, por triplicado, 20 μl de 2-3 ^3H GABA (7.9 nM final y actividad específica 30.3 Ci/mmol) y 250 μl de membranas sinápticas. A los tubos destinados a elaborar la curva estandar se les añadió 20 μl de GABA no marcado conteniendo de 15-250 picomoles y a los tubos experimentales 210 μl de LCR. Finalmente el volumen de todos los tubos se ajustó con agua a 500 μl . Los tubos se incubaron por 10 min. en hielo para alcanzar el equilibrio de la unión del GABA a su receptor y la reacción se suspendió por centrifugación a 48,000g/10 min. El pellet se lavo superficialmente por adición y decantación de 2 ml de agua fría y las membranas lavadas son posteriormente digeridas con NaOH 1N a 37°C por 24 hrs. Finalmente el material digerido es neutralizado con HCl 1N y transferido cuantitativamente a viales que contiene 5 ml de Tritosol ; $(^{85})$ midiéndose la radioactividad por centelleo

líquido en un espectrometro Beckmann LS-1701 con una eficiencia para Tritio de cerca del 30%.

El GABA conjugado fue medido bajo las mismas condiciones que el GABA libre pero utilizando una alícuota de LCR hidrolizada y neutralizada. La hidrólisis se llevo a cabo en HCl 6N a 100°C durante 24 hrs y la neutralización se efectuó añadiendo una cantidad suficiente de NaOH 6N para alcanzar un pH de 6.8 a 7.2

Evaluación estadística de los resultados.

El análisis estadístico aplicado fue un análisis de varianza ANOVA (OneWay) seguido de la prueba de Fisher para obtener el grado de significancia estadístico entre los distintos grupos.

MATERIALES:

EL 2-3 [H^3] GABA (con 30.3 Ci/mmol de actividad específica) fue obtenido de New England Nuclear, Boston Massachusetts U.S.A. El GABA, el Tritón X-100 fueron productos obtenidos de Sigma Chemical Co. St. Louis Missouri U.S.A. ;el resto de las sustancias utilizadas fueron obtenidas de fuentes comerciales locales.

RESULTADOS

Como se mencionó en la sección de métodos en el presente estudio se analizó el contenido de GABA libre y de GABA conjugado en 88 LCR de pacientes afectados por distintas enfermedades neurológicas.

En la fig. 1 se muestran algunas características de la población estudiada, como puede observarse la mayoría de los pacientes estudiados tuvieron diagnosticos de epilepsia, cisticercosis, y enfermedades cerebro-vasculares, en tanto que sólo algunos de ellos estaban afectados por otros tipos de padecimientos neurológicos como distonias e infecciones del tipo de la encefalitis viral. Como puede observarse la distribución por sexos en la población en general fué mas o menos parecida aún cuando llegaron a predominar los hombres en la enfermedad de Parkinson, en la cisticercosis y en las distonias, en tanto que las mujeres predominaron en los desordenes del tipo de las infecciones de encefalitis viral y en las enfermedades cerebro-vasculares.

Desde el punto de vista de la edad la fig. 2 muestra lo que clínicamente debia esperarse : que la población de pacientes de mayor edad corresponde a aquellos que padecen algún desorden neurodegenerativo o ligado a la arteroesclerosis como lo son la enfermedad de Parkinson y las enfermedades cerebro-vasculares respectivamente en tanto que la población mas joven quedo distribuída entre los grupos de los padecimientos referidos como

epilepsia, cisticercosis y esclerosis múltiple.

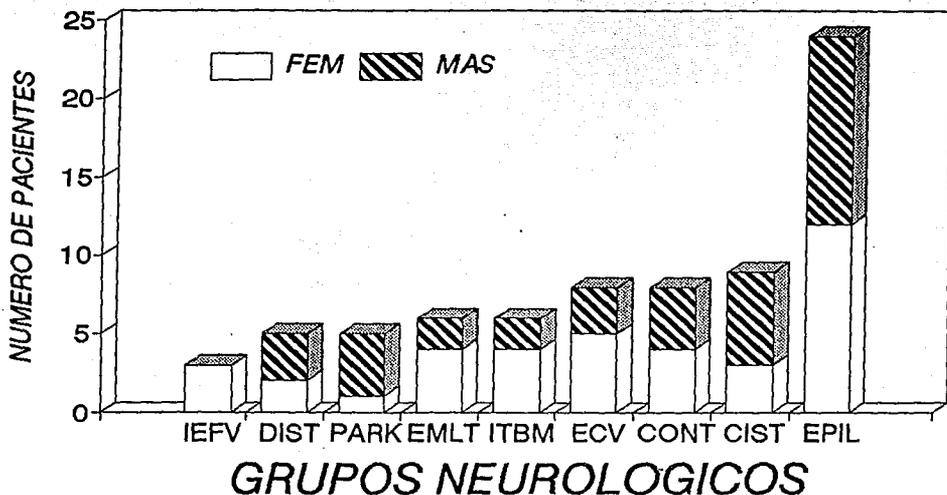


FIG. 1- La figura muestra la distribución de los pacientes de acuerdo a la entidad nosológica que los afectaba. Su distribución por sexo se indica en cada barra de acuerdo al código señalado en la figura.

En esta y en las figuras restantes, el nombre de cada enfermedad se indica utilizando las siguientes abreviaturas. control (CONT), epilepsia (EPIL), cisticercosis (CIST), esclerosis múltiple (EMLT), distonía (DIST), enfermedad de Parkinson (PARK), enfermedades-cerebrovasculares (ECV), infección encefalitis viral (IEFV), infección tuberculosis miliar (ITBM).

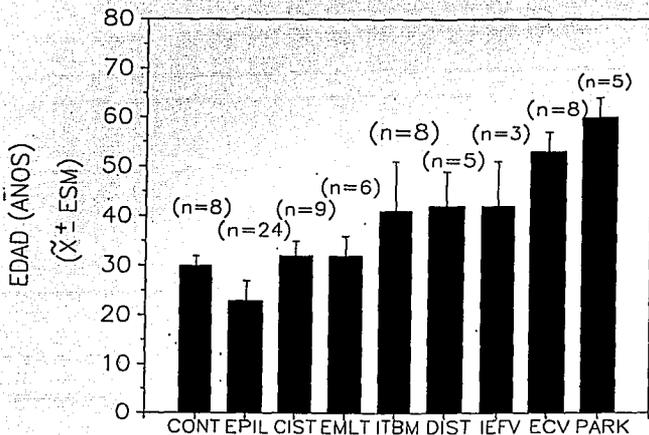


FIG. 2- Se muestra la distribución de las edades promedio de los distintos grupos de pacientes estudiados, en la ordenada se indica la edad promedio de los pacientes agrupados de acuerdo al cuadro clínico \pm error estandar que aparece en la abscisa.

Por lo que toca al grupo control utilizado para evaluar a los grupos de pacientes es importante señalar que estuvo integrado por 8 individuos que clínicamente solo presentaban cuadros tensionales caracterizados por la presencia de cefaleas más o menos intensas y en donde la distribución por sexo fue idéntica. Como se indica en las fig. 3 y 4 no se encontraron diferencias significativas en los niveles de GABA tanto libre como conjugado atribuibles al sexo. La edad promedio del grupo fue de 30 años (fig. 2)

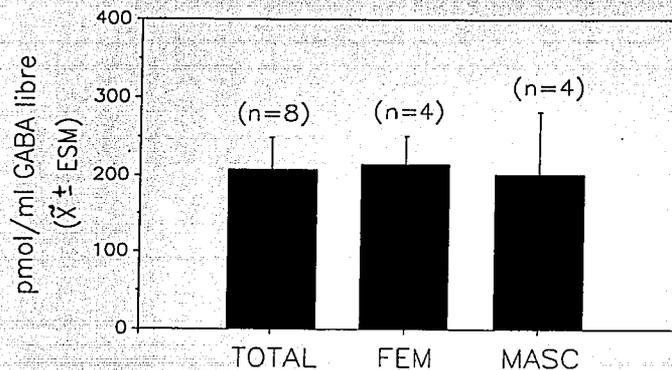


FIG. 3- Contenido de GABA libre en el LCR de pacientes control ; la ordenada muestra los niveles de GABA, y la abcisa indica la población considerada (total o separada de acuerdo al sexo).

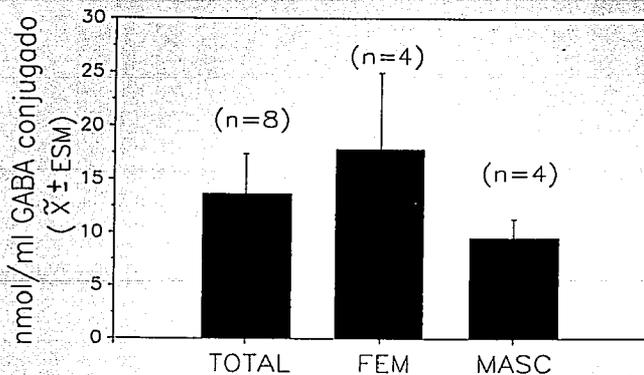


FIG. 4- Contenido de GABA conjugado en el LCR de pacientes control ; la ordenada muestra los niveles de GABA y la abcisa indica la población considerada (total o separada de acuerdo al sexo).

EPILEPSIA

Las figuras 5,6,7 y 8 muestran los niveles de GABA libre y GABA conjugado encontrados en el LCR de pacientes diagnosticados como epilépticos. Como puede observarse en las fig. 5 y 6 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de este aminoácido, tanto en lo que toca a su forma libre como conjugada cuando los valores promedio se compararon con los valores control. Lo mismo ocurrió cuando la comparación se hizo considerando el sexo de los enfermos. Cuando los pacientes epilépticos se segregan de acuerdo a su medicación previa, como puede observarse en la fig. 7 el contenido de GABA libre de los pacientes tratados con Carbamazepina (CBZ) fue significativamente menor que el del promedio de los controles, o del grupo epiléptico completo o que el de los pacientes tratados con difenilhidantoina (DFH) o ácido valproico (VAP). Sin embargo por lo que toca a los niveles de GABA conjugado únicamente se encontró una tendencia estadísticamente no significativa a una disminución en el grupo de los pacientes con CBZ. (fig. 8)

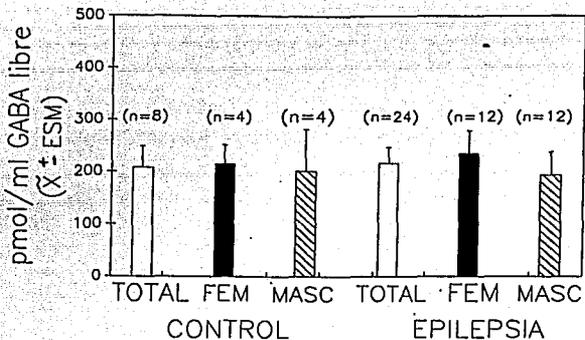


FIG. 5- Contenido de GABA libre en pacientes control y en pacientes epilépticos. Para cada uno de los dos grupos considerados la ordenada muestra los niveles de GABA y la abscisa indica la población de pacientes considerada completa (barra abierta) femenina (barra cerrada), masculina (barra marcada con diagonales).

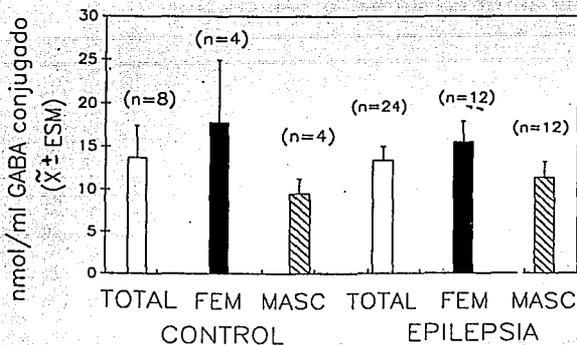


FIG. 6- Contenido de GABA conjugado en pacientes control y en pacientes epilépticos. Para cada uno de los dos grupos considerados la ordenada muestra los niveles de GABA y la abscisa indica la población de pacientes considerada completa (barra abierta) femenina (barra cerrada), masculina (barra marcada con diagonales).

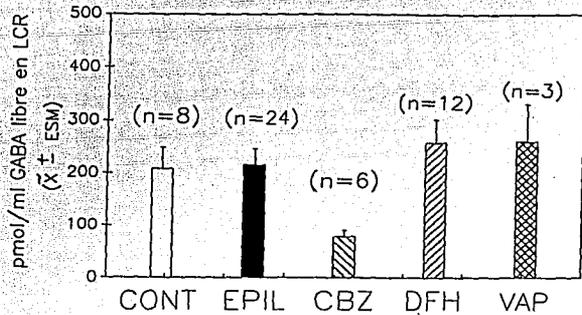


FIG. 7- Contenido de GABA libre en pacientes control y en pacientes epilépticos. Se muestra asimismo la distribución de este último grupo de acuerdo a la medicación recibida. Carbamazepina (CBZ), Difenhidantohina (DFH), y ácido valproico (VAP). La ordenada muestra los niveles de GABA la abscisa señala los valores correspondientes a cada grupo de pacientes Control (CONT) y Epilepsia (EPIL). * P < 0.05

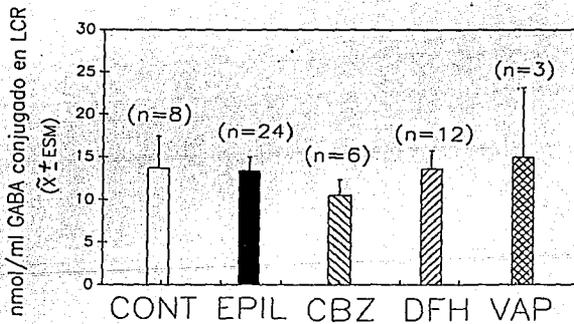


FIG. 8- Contenido de GABA conjugado en pacientes control y en pacientes epilépticos tratados con diferentes medicamentos. Se muestra asimismo la distribución de este último grupo de acuerdo a la medicación recibida. Carbamazepina (CBZ), Difenhidantohina (DFH), y ácido valproico (VAP). La ordenada muestra los niveles de GABA la abscisa señala los valores correspondientes a cada grupo de pacientes. Control (CONT) y Epilepsia (EPIL).

CISTICERCOSIS (CIST)

Como se muestra en la fig. 9 el contenido de GABA libre en aquellos pacientes afectados por Cisticercosis se encontro significativamente elevado en comparación con el grupo Control. El analisis por sexo reveló que aunque en los pacientes masculinos los niveles de GABA eran elevados, el grupo de pacientes femeninos fue el que mas contribuyó a esta elevación. El GABA conjugado no presentó ninguna modificación en estos enfermos. (fig. 10)

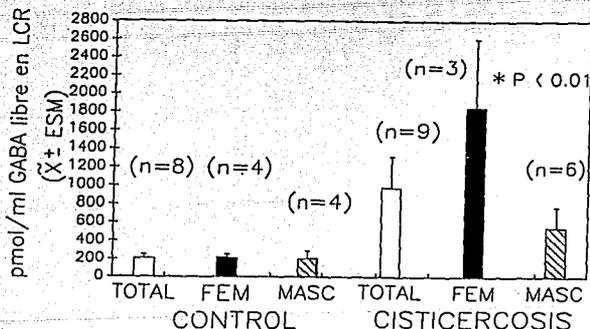


FIG. 9- Contenido de GABA libre en pacientes control y en pacientes con cisticercosis la ordenada muestra los niveles de GABA la abcisa indica la población de pacientes estudiados completa (barra abierta) o femenina (barra cerrada), masculina (barra marcada con diagonales). La abcisa señala los valores correspondientes al grupo de pacientes (CONT) y aquellos con cisticercosis (CIST). Para el análisis estadístico ver la sección correspondiente en materiales y métodos.

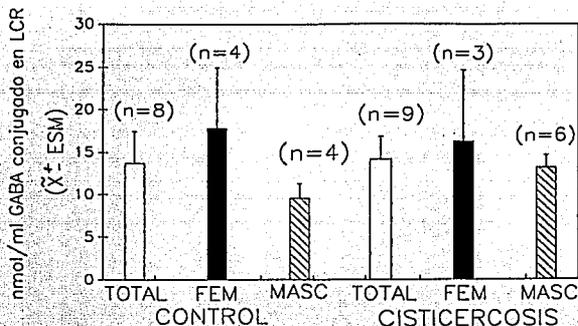


FIG. 10- Contenido de GABA conjugado en pacientes control y en pacientes con cisticercosis la ordenada muestra los niveles de GABA la abcisa indica la población de pacientes estudiados completa (barra abierta) o femenina (barra cerrada), masculina (barra marcada con diagonales). La abcisa señala los valores correspondientes al grupo de pacientes (CONT) y aquellos con cisticercosis (CIST). Para el análisis estadístico ver la sección correspondiente en materiales y métodos.

OTRAS ENFERMEDADES

Los resultados de la medición de GABA libre y conjugado en LCR de pacientes con diversas enfermedades neurológicas se muestra en las figuras 11 y 12. Como puede observarse en la fig. 11 no se encontró ninguna modificación significativa en los niveles de GABA libre en los pacientes afectados por tuberculosis miliar, esclerosis múltiple, enfermedades cerebro-vasculares, diversos tipos de distonias, o por la enfermedad de Parkinson. El análisis por sexo no mostró tampoco ningún cambio en los niveles del aminoácido. (datos no mostrados).

En forma similar el GABA conjugado no experimentó modificaciones en estos pacientes. (fig. 12) Como ocurrió con el GABA libre el análisis por sexo no mostró cambios significativos en el contenido

de GABA conjugado (datos no mostrados).

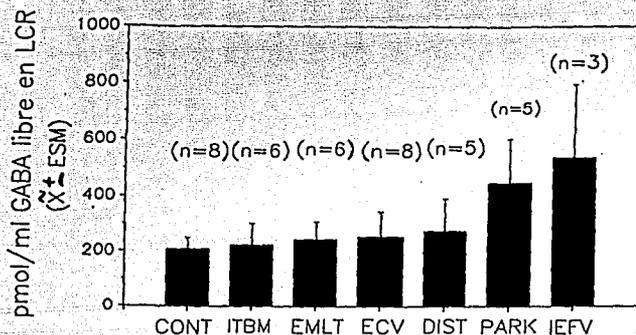


FIG. 11- La figura presenta el contenido de GABA libre en pacientes control y en pacientes afectados por diversas enfermedades neurológicas la ordenada muestra los niveles de GABA y la abcisa muestra los distintos grupos de enfermos estudiados para abreviaturas ver la fig. no 1

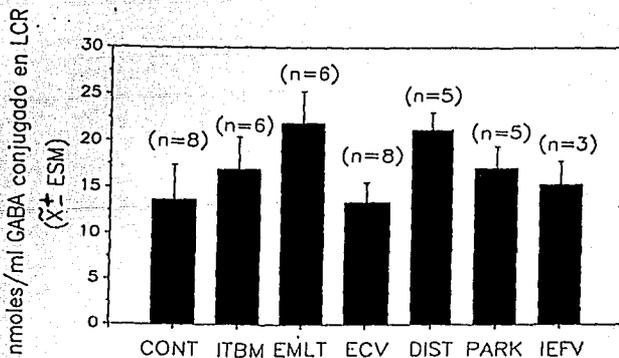


FIG. 12- La figura presenta el contenido de GABA conjugado en pacientes control y en pacientes afectados por diversas enfermedades neurológicas ; la ordenada muestra los niveles de GABA la abcisa muestra los distintos grupos de enfermos estudiados para abreviaturas ver la fig. no. 1

DISCUSION

Es indudable que el GABA juega un papel fundamental en el funcionamiento del SNC de los mamíferos, pues como quedo señalado anteriormente esta sustancia no sólo posee poderosas acciones hiperpolarizantes que impiden el efecto de las acciones depolarizantes excitatorias de otros neurotransmisores ^(9,10) sino que además se encuentra profusamente distribuido dentro del SNC, pudiendose señalar que no existe prácticamente región anatómica de este sistema que escape a sus acciones inhibitoras. ^(55,56)

No es sorprendente en consecuencia que a las neuronas GABAérgicas se les haya asignado un papel importante en prácticamente todas las manifestaciones funcionales del SN ; desde las vegetativas hasta las cognoscitivas, pasando por aquellas que tienen que ver con la integración sensori-motora y de que como un corolario obligado de esta participación funcional tan amplia se haya postulado una alteración en los sistemas GABAérgicos en diversos tipos de alteraciones neurológicas y psiquiátricas. Así una disminución en la actividad GABAérgica ha sido invocada en la génesis de alteraciones neurológicas tan difundidas en la población como son la epilepsia, ^(72,73,80) la enfermedad de Parkinson, ^(76,77) la Corea de Hungtinton, ^(70,78) los transtornos afectivos y la misma esquizofrenia entre otros. ^(79,80,81)

Como consecuencia de lo anterior y debido a que muchas de las evidencias que ligan al funcionamiento de las neuronas GABAérgicas

con alteraciones patológicas provienen de experimentos realizados en animales se ha tratado en años recientes de buscar indicadores válidos que permitan evaluar la función GABAérgica en individuos sanos o enfermos en un intento por establecer o descartar en forma mas directa la presencia de alteraciones funcionales GABAérgicas en diversos tipos de enfermedades neurológicas o psiquiátricas.

Dado que por razones obvias no es posible obtener en forma rutinaria material cerebral proveniente de pacientes para estudiar la participación de las neuronas GABAérgicas en la patología del SN, se ha intentado en diversos laboratorios indagar si los niveles de GABA en el LCR o en el plasma pudieran correlacionarse con alguna alteración neuropatológica de este sistema. El problema aunque simple en apariencia se encuentra obstaculizado por factores tan diversos como las características físicas de la población a estudiar (sexo, edad, estado nutricional rasgos culturales etc), la duración y estado de evolución de los padecimientos explorados, el tipo y duración de las medidas terapéuticas utilizadas para corregirlas, las diferencias de criterio en el diagnóstico de los enfermos, el tipo de metodología utilizada para la cuantificación del GABA, así como los cuidados utilizados para tomar la muestra y almacenarla hasta el momento de su medición.

La posibilidad de contar con criterios, que permitan evaluar la función GABAérgica en individuos sanos y enfermos ha sido un aliciente para que en muchos laboratorios se haya tratado de

establecer los valores normales de GABA en estos líquidos y estudiar su variación en poblaciones de pacientes afectados por diversas enfermedades con un criterio tanto de diagnóstico como de pronóstico.

En el presente trabajo de tesis se ha medido el nivel de GABA tanto libre como conjugado en una población de 88 pacientes provenientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN). El estudio como ha sido señalado en su oportunidad (ver Materiales y Métodos) fue conducido en forma "doble ciego" de tal forma que ni el personal del hospital encargado de tratar y estudiar a los enfermos ni el personal del Instituto de Fisiología Celular encargado de realizar las mediciones de GABA conociera de antemano según el caso, ni las características clínicas de los pacientes ni los valores obtenidos para este aminoácido. Al momento de concluirse el estudio los valores de GABA obtenidos fueron asignados a cada paciente de acuerdo al No. de expediente registrado y las posibles correlaciones entre valores de GABA libre y/o conjugado con padecimientos definidos fueron estudiados estadísticamente. El estudio tuvo por objeto coadyuvar en el establecimiento de los valores normales de GABA en los sujetos sanos y evaluar sus posibles modificaciones en diversos estados patológicos con fines tanto de diagnóstico como de pronóstico.

La población estudiada estuvo constituida como ya fue mencionado por 88 pacientes que se distribuyeron de acuerdo a las entidades nosológicas que se indican en la figura 1. Los pacientes se

distribuyeron en cada una de las enfermedades de acuerdo al sexo en forma más o menos uniforme, con excepción de la encefalitis viral que estuvo integrada totalmente por mujeres, y de la enfermedad de Parkinson constituida mayoritariamente por pacientes del sexo masculino. La edad de los pacientes osciló entre 14 y 76 años correspondiendo las edades más avanzadas a aquellos pacientes afectados por enfermedades degenerativas como enfermedad de Parkinson o afectadas por enfermedades cerebro-vasculares (ECV) (Fig. 2). Los pacientes más jóvenes correspondieron a aquellos afectados por epilepsia o distintos tipos de enfermedades infecciosas. Por lo que toca al grupo control aunque hubiera sido deseable contar con un grupo de individuos completamente sanos por razones éticas no fue posible, tomándose en consecuencia como grupo control a aquel integrado por pacientes cuyo cuadro clínico correspondió a cefaleas de tipo tensional en los que no se ha descrito ningún cambio en los niveles de GABA y que ha sido costumbre en diversos laboratorios utilizarlos como pacientes control. (81)

valores control

Como ha sido mencionado existe considerable controversia con respecto a estos valores. Las diferencias de los distintos grupos aunque pudieran ser debidas a factores de tipo racial, nutricional, o cultural son con toda probabilidad se deben a

diferencias en la obtención y almacenamiento de los LCR's pues se ha descrito un gradiente de concentración cefálico-caudal de GABA, (68,87) y la existencia de distintas formas de este aminoácido; dentro de las que se incluyen una forma de GABA libre y una forma conjugada, constituida por 2-pirrilidinona (forma cíclica del GABA), y diversos péptidos que contienen GABA como la homocarnosina (GABA-histidina). (65) Adicionalmente se sabe que durante el almacenamiento existe una disminución de GABA conjugado y un incremento del GABA libre (71,72) debido muy probablemente a una hidrólisis enzimática del GABA conjugado cuando no se toman medidas tales como : la toma de la muestra en frío, su almacenamiento a -70° C y la desproteínización precoz de los líquidos. Finalmente las modificaciones en los niveles de GABA encontrados pudiera obedecer a la metodología utilizada para su medición, que como ha sido mencionado va desde las técnicas del radioreceptor al GABA hasta técnicas tan sofisticadas como las de la cromatografía de gases asociada a la espectrofotometría de masas, pasando por técnicas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Conscientes de este tipo de variables ; en este estudio las muestras fueron siempre tomadas entre el 3^o y 4^o espacio lumbar con el objeto de evitar el efecto del gradiente cefálico-caudal de GABA. Mas aún, en un intento por minimizar la hidrólisis de las muestras de GABA las muestras fueron tomadas en frío y almacenadas en el laboratorio a -70° C hasta el día de su análisis, y

finalmente con objeto de destruir cualquier factor enzimático responsable de la hidrólisis del GABA conjugado las alícuotas usadas para los análisis fueron desproteinizadas por ebullición.

Dentro de nuestro grupo control no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la población masculina y la femenina tanto para el GABA libre como para el GABA conjugado. (fig. 3 y 4) El valor obtenido por nosotros para el GABA libre (ambos sexos) fue 208 ± 41 pmoles/ml y concuerda con el obtenido por Wood et al., 1979 ⁽⁶⁶⁾ (239 ± 91 pmoles/ml), Manyam et al., ⁽⁶⁸⁾ (239 ± 76 pmol/ml) Bohlen et al., ⁽⁶⁷⁾ (220 ± 81 pmoles/ml) para pacientes neurológicamente sanos o voluntarios normales pero es ligeramente mayor que el encontrado por Ferraro et al., 1983, (135 ± 17 pmoles/ml)⁽⁷²⁾ o Wood et al., 1978. ⁽⁸⁹⁾ (126 ± 13 pmoles/ml y 157 ± 17 pmol/ml). El GABA conjugado en cambio, en nuestro estudio fue mayor que el reportado por Uhlhaas et al., 1986 ⁽⁷⁰⁾ ($3.31 \pm .43$ nmol/ml) y Manyam and Tremblay. ⁽⁹⁰⁾ (4.65 ± 1.92 nmol/ml). Las razones para esta diferencia no son claras pero pudieran estar ligadas al tipo de método utilizado puesto que en tanto nosotros utilizamos la técnica del radioreceptor para la medición del GABA los otros autores utilizaron métodos de HPLC que como se sabe son mas específicos para la medición del GABA.

EPILEPSIA

La serie más grande de pacientes estudiados correspondió a pacientes con diagnóstico de epilepsia pues de los 88 pacientes estudiados 24 estaban afectados por este padecimiento. (fig. 1).

Aunque ha sido sugerido que un defecto en el sistema GABAérgico pudiera existir en la epilepsia, cuando los valores promedio de los niveles tanto de GABA libre como conjugado correspondiente al total de nuestros pacientes se comparó con los de los controles no se observó ninguna diferencia significativa. Lo mismo ocurrió cuando los pacientes fueron separados en grupos de acuerdo a su sexo. (fig. 5,6) Nuestros resultados están de acuerdo con los reportados por Manyam y Tremblay 1984, ⁽⁶⁰⁾ Crawford, Chadwick 1987 ⁽⁶¹⁾ y Araky *et al* 1985 ⁽⁶²⁾ y difieren de aquellos reportados por Wood *et al* 1979 ⁽⁶⁶⁾ quienes encontraron una disminución en los niveles de GABA libre. Sin embargo, si los pacientes epilépticos son agrupados de acuerdo a la medicación recibida y comparados con los controles es posible observar una disminución estadísticamente significativa en el GABA libre de los pacientes tratados previamente con Carbamazepina. (fig. 7)

El hallazgo resulta sorprendente por no existir evidencias de que la carbamazepina pudiera ejercer un efecto inhibitor sobre el metabolismo del GABA o estimular a las neuronas GABAérgicas a liberar a su neurotransmisor. Por otro lado los pacientes tratados con ácido valproico mostraron una ligera tendencia no

significativa a presentar niveles mas altos en GABA libre, (fig. 7) de ahí que este efecto pudiera estar relacionado con la acción inhibidora de esta sustancia sobre la destrucción del GABA. (9)

CISTICERCOSIS

El principal hallazgo reportado en esta tesis es un aumento estadísticamente significativo en los niveles de GABA libre en pacientes con Cisticercosis cerebral. (Fig. 9) Sin embargo en estos pacientes no fue posible observar cambios significativos en los niveles de GABA conjugado. (fig. 10) El hallazgo resulta sumamente interesante por el hecho de que no existen datos en la literatura que indiquen que la presencia de cisticercos pudiera modificar la transmisión GABAérgica. La elevación de los niveles de GABA libre reportada en esta tesis podría reflejar en consecuencia la liberación de este aminoácido hacia el LCR como consecuencia de la destrucción tisular provocada por el padecimiento. La falta de cambios concomitantes en los niveles de GABA conjugado no es fácil de explicar debido a que se desconoce cabalmente la relación que hay entre el GABA libre y las formas de GABA conjugado presentes en el LCR. Pudiera especularse sin embargo, que de haber un equilibrio dinámico entre estas dos formas de GABA la presencia de alguna o algunas sustancias producidas a consecuencia de la cisticercosis pudiera favorecer la transformación de GABA conjugado en libre en el LCR.

Alternativamente el GABA libre presente en el LCR de pacientes con cisticercosis pudiera aumentar debido a una disminución en la formación o un aumento en la destrucción de alguna de las formas minoritarias de GABA conjugado (homocarnosina, de algún otro péptido que contenga GABA). De cualquier manera, sea cuál fuere el mecanismo de elevación de los niveles de GABA libre en el LCR de los pacientes con cisticercosis, la presencia de los niveles elevados de este neurotransmisor pudiera tener utilidad medica al servir como un indicador diagnóstico y/o pronóstico de la cisticercosis cerebral.

OTROS PADECIMIENTOS

Como fue anotado en la sección de resultados no fue posible detectar cambios significativos ni en el GABA libre ni en el GABA conjugado en pacientes con tuberculosis miliar, esclerosis múltiple, enfermedades cerebro-vasculares, distonias diversas, encefalitis viral o enfermedad de Parkinson. Nuestros resultados son hasta nuestro conocimiento los primeros reportados para la tuberculosis miliar y encefalitis viral pero deben tomarse como preliminares por la pequeña cantidad de muestras estudiadas para cada una de estas enfermedades. Por lo que toca a la enfermedad de Parkinson muchos de los autores coinciden en que existe una disminución de GABA libre en el LCR de pacientes afectados con esta enfermedad. (76,77,81,90) Nuestros resultados sin embargo

coinciden con los reportados por Bonnet 1987⁽⁹⁴⁾ y los de Manyam y Tremblay para el GABA conjugado⁽⁹⁰⁾ e indican que en estos pacientes no existen variaciones ni en el GABA libre ni en el conjugado. Estas discrepancias en los niveles de GABA libre no son fáciles de explicar pero pudieran estar ligadas tanto a las características clínicas de los pacientes examinados o a las diferencias de metodología empleadas para medir los niveles de GABA.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que las mediciones de GABA tanto libre como conjugado en LCR son relativamente insensibles a sufrir modificaciones en diversos tipos de padecimientos neurológicos, pues en nuestro estudio sólo fue posible observar un aumento de GABA libre en LCR de pacientes afectados por cisticercosis cerebral, este efecto pudiera ser utilizado como una herramienta diagnóstica y/o pronóstica en el manejo de este tipo de enfermos.

Las mediciones de GABA conjugado parecen sin embargo tanto en nuestras estudio y de acuerdo con la mayor parte de los laboratorios que lo han medido, poco efectivas para ser utilizadas en los estudios clínicos de pacientes con enfermedades neurológicas pues prácticamente en ningún estudio se han observado cambios significativos. (90,92,95,96)

La razón por la cual el GABA en el líquido cefalorraquídeo es tan refractaria a sufrir cambios en padecimientos en los que existen numerosas evidencias que indican que el sistema GABAérgico tiene participación ; en nuestra opinión refleja el hecho de que el sistema GABAérgico es ubicuo y la concentración del GABA en LCR de numerosos sistemas neuronales no afectados oscurecerían los cambios en los niveles de GABA que pudieran presentarse a consecuencia de alteraciones en tal o cuál sistema GABAérgico específico. Dado que las diferencias de concentraciones entre

ambas formas de GABA favorece por varios ordenes de magnitud a la forma conjugada una pequeña cantidad de esta al transformarse en GABA libre pudiera pasar desapercibida pero elevaría notoriamente la concentración de GABA libre.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS

- 1- Kolb, B. y Whishaw, I. D., (1970) Fundamentals of Human Neuropsychology. (Atkinson, R. C., Lindzey, G. and Thompson, R. F. eds. 3a ed.) Freeman. New York.
- 2- Hole, H. W. (1990) Human Anatomy and Physiology (Jaffe, E. G. eds. 5a ed.) Brown Publishers. U.S.A.
- 3- Awapara, J., Lendua, A. J., Fuerst, R. y Seale, B. (1950) Free Gamma-Aminobutyric acid in brain. J. Biol. Chem. 187:35-39.
- 4- Roberts, E. y Frankel, S. (1950) γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. J. Biol. Chem. 187:55-63.
- 5- Saliganicoff, L. y De Robertis, E. (1965) Subcellular distribution of the enzymes of the glutamic acid, glutamine and γ -aminobutyric acid cycles in rat brain. J. Neurochem. 12:287-309.
- 6- Fonnum, F. (1968) The distribution of glutamate decarboxilase and aspartate transaminase in subcellular fractions of rat and guinea pig brain. Biochem. J. 106:401-412.
- 7- Iversen, L. L., y Kravitz, E. A. (1968) The metabolism of γ -aminobutyric acid (GABA) in the lobster nervous system-uptake of GABA in nerve-muscle preparations. J. Neurochem. 15:609-620.
- 8- Henn, F. A. y Hamberger, A. (1971) Glia cell function: Uptake of transmitter substances. Proc. Nat. Acad. Sci (U.S.A.) 68:2686-2690.
- 9- Krnjevic, K. y Schwartz, S. (1967) The action of γ -Aminobutyric

- acid on cortical neurones. Exp. Brain Res. 3:320-336.
- 10- Curtis, D. R., Duggan, A. W., Felix, D., Jhonston, G. A. R., y McLennan, H. (1971) Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. Brain Res. 33:53-73.
- 11- Srinivasan, V., Neal, M. J. y Mitchell, J. F. (1969) The effect of electrical stimulation and high potassium concentrations on the efflux of (³H) γ -aminobutyric acid from brain slices. J. Neurochem. 16:1235-1244.
- 12- Obata, K. y Takeda K. (1969) Release of GABA into the fourth ventricle induced by stimulation of the cat cerebellum. J. Neurochem. 16:1043-1047.
- 13- Fonnum, F., Storm-Mathisen, J. y Walberg, F. (1970) Glutamate decarboxilase in inhibitory neurons. A study of the enzyme in Purkinje cells axons and boutons in the cat. Brain. Res. 20:259-275.
- 14- Roberts, E., y Simonsen, D. G. (1963) some properties of L-glutamic decarboxilase in mouse brain. Biochem. Pharmacol. 12:133-134.
- 15- Bayon, A., Possani, C. D., y Tapia, R. (1977) Kinetics of brain glutamate decarboxilase inhibition studies with N-(5'-Phosphophiridoxil) Aminoacids. J. Neurochem. 29:513-517.
- 16- Pérez de la Mora, M., Feria-Velasco, A., y Tapia, R. (1973) Piridoxal phosphate and glutamate decarboxilase in subcellular particles of mouse brain and their relationship to convulsions J. Neurochem. 20:1575-1587.

- 17- Blindermann, J.-M., Maitre, M., Ossola, L., y Mandel, P. (1978) Purification and some properties of L-glutamate decarboxylase from human brain. Eur. J. biochem. 86:143-152.
- 18- Spink, D. C., Porter, T. G., Wu, S. J. y Martin, D. L. (1985) Characterization of three kinetically distinct forms of glutamate decarboxylase from pig brain Biochem. J. 231:695-703
- 19- Denner, L. A., Wei, S. C., Lin, H. S. Lin, C.-T. y Wu, J.-Y. (1987) Brain L-glutamate decarboxylase purification and subunit structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:668-672.
- 20- Wu, J.-Y., Matsuda, T., y Roberts, E. (1973) Purification and Characterization of glutamate decarboxylase from mouse brain. J. Biol. Chem. 248:3029-3034.
- 21- Denner, L. A., y Wu, J.-W. (1985) Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate. J. Neurochem. 48:957-965.
- 22- Waksman, A. y Roberts, E. (1965) Purification and some properties of mouse brain gamma-aminobutyric- α -ketoglutaric acid transaminase. Biochemistry. 4:2132-2138.
- 23- McGeer, P. L., Eccles, J. C., y McGeer, E. G. (1978) Molecular Neurobiology of the Mammalian brain. Plenum press. New York.
- 24- Llinas, R. R., y Heuser, J. E. (1977) Depolarization-release coupling systems in neurons. Neurosci. Res. Prog. Bull. 15:557-687.
- 25- Cotman, C. W., Haycock, J. W., y White, W. F. (1976)

- Stimulus-secretion coupling process in brain : Analysis of noradrenaline and Gamma aminobutyric acid release. J. Physiol. (Lond.) 254:475-505.
- 26- Blaustein, M. P. y Goldring, J. M. (1975) Membrane potentials in pinched-off presynaptic terminals monitored with a fluorescent probe : evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. J. Physiol. (Lond.) 247:589-615.
- 27- Nadler, J. V., White, W. F., Vaca, K. W., Redburn, D. A., y Cotman, C. W. (1977) Characterization of putative amino acid transmitter release from slices of rat brain dentate gyrus. J. Neurochem. 29:279-290.
- 28- Grasso, A. y Sanni M. I. (1979) A toxin purified from the venom of black widow spider affects the uptake and release of radioactive γ -aminobutyrate and N-epinephrine from rat brain synaptosomes. Eur. J. Biochem. 102:337-344.
- 29- Olsen, R. W., Ticku, M. K., Van Ness, F. C., y Greenle, D. (1978) Effects of drugs on γ -aminobutyric acid receptors, uptake, release and synthesis in vitro. Brain Res. 139:277-294
- 30- Tossman, U., Jonason, G., y Ungerstedt (1896) Regional distribution and extracellular levels of amino acids in rat central nervous system. Acta Physiol. Scand. 127:533-545.
- 31- Fagg, G. E. y Lane, J. D. (1979) The uptake and release of putative Amino acid neurotransmitters Neuroscience 4:1015-1036
- 32- Minchin, M. C. W. (1980b) The role of Ca^{2+} in the protoveratrine-induced release of γ -aminobutyrate from brain

- slices. Biochem. J. 190:333-339.
- 33- De Belleruche, J. S., y Bradford, H. F. (1977) On the site of origin of transmitter Aminoacids released by depolarization of nerve terminals in vitro. J. Neurochem. 29:335-343.
- 34- Fonnum, F., Paulsen R. H., Fosse, V. M., y Engelsaen, B. (1986) Synthesis and release of of amino acids neurotransmitters, an Excitatory amino acidé and Epillepsy (Schwarcz R. y Ben-Ari Y., eds) pp. 285-293 Plenum Press, New York.
- 35- Haycock, J. W., Levy, W. B., y Cotman, C. W. (1977) Pentobarbital depression of stimulus-secretion coupling in brain-selective inhibition of despolarization-induced calcium dependent release. Biochem. Pharmacol. 26:159-161.
- 36- Reubi, J. C., Van Den Berg, C., y Cuenod, M. (1978) Glutamine as precursor for the GABA and glutamate transmitters pools. Neurosci. Lett. 10:171-174.
- 37- Curtis, D. R., Duggan, A. W., Felix, D., y Johnston, G.A.R. (1970) GABA, bicuculline and central inhibition. Nature 226:1222-1224.
- 38- Bowery, N. G., Hill, D. R., Hudson, A. L., Doble, A., Middlemiss, D. N., Shaw, J., y Turnbull, M. J. (1980) (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. Nature 283:92-94.
- 39- Enna, S. J. y Karbon, E. W. (1986) GABA receptors: a overview En : Benzodiazepine / GABA receptors and chloride channels :

- structural and functional properties. (Olsen, R. W., y Craig, J. V. eds.) Alan R. Liss, Inc., New York. pp. 41-54.
- 40- Enna, S. J. y Snyder, H. S. (1975) Properties of γ -Aminobutyric acid (GABA) receptor binding in rat brain synaptic membrane fractions Brain Res. 100:81-97.
- 41- McCabe, R. T., y Wamsley, J. K., (1984) Autoradiographic localization of subcomponents of the macromolecular GABA receptor complex. Life Sci. 39 1937-1945.
- 42- Yasui, S., Ishizuka, S., y Akaike, N. (1985) GABA activates different types of chloride-conducting receptor ionophore complexes in a dose-dependent manner. Brain Res. 33:176-180.
- 43- Akaike, N., Hattori, K., Omura, Y., y Carpenter, D. O. (1985) Bicuculline and Picrotoxine block γ -Aminobutyric acid-gated Cl^- conductance by different mechanisms. Experientia 41:70-71
- 44- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencore, T. A., Seeburg, P. H., y Barnard, E. A. (1987) Sequence and expression of GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. Nature (Lond). 328:221-227
- 45- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencore, T. A., Seeburg, P. H., y Barnard, E. A. (1987) The brain GABA_A receptor: cloning and functional expression of the cDNAs encoding its subunits. Nature 328:221-227.

- 46- Pasantés, H., Sánchez, J., y Tapia, R. (1971) Neurobiología Celular. SEP-Fondo de Cultura Económica. México
- 47- Gawwiler, B. H. y Brown, D. A. (1985) GABA_A receptor activated K⁺ current in voltage clamped CA3 pyramidal cells on hippocampal cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:1558-1562.
- 48- Robertson, E. y Taylor, W. R. (1986) Effects of γ -Aminobutyric acid and (-)Baclofen on calcium and potassium currents in cat dorsal root ganglion neurones in vitro. Br. J. Pharmacol. 89:661-672.
- 49- Fonnum, F. (1978) Amino acids as chemical transmitters (F. Fonnum, ed) Plenum Press New York. pp. 143-153.
- 50- Tapia, R. (1975) Biochemical Pharmacology of GABA in CNS. En : Handbook of Psychopharmacology. vol. 4. (Iversen, L. L., Iversen, S. D. y Snyder, S. H. eds.). Plenum Press New York pp. 1-58.
- 51- Schechter, P. J. Tranter, Y., Jung, M. J., y Bohlen, P. (1977b) Audiogenic seizure protection by elevated brain GABA concentration in mice : effects of γ -acetylenic GABA and γ -vinyl GABA, two irreversible GABA-T inhibitors. European J. Pharmacol. 45:319-329.
- 52- Krosgaard-Larsen, P. y Johnston, G.A.R. (1975) Inhibition of GABA uptake in rat brain slices by nipecotic acid, various isoxasoles and related compounds. J. Neurochem. 25:797-802.
- 53- Amino-acids neurotransmitters. En : The biochemical basis of

- Neuropharmacology. (Cooper, J. R., Bloom, F. E. y Roth, R. H. eds.), 5a edic. New York Oxford (1986) cap. 7 pp. 124-172
- 54- Matsumoto, R. R. (1989) GABA Receptors : Are cellular differences reflected in function ? Brain Res. Rev. 14:203-225
- 55- Pérez de la Mora, M., Possani, L. D., Tapia, R., Teran, L., Palacios, R., Fuxe, K., Hokfelt, T., y Ljungdahl, A., (1981) Demonstration of central γ -aminobutyrate-containing nerve terminals by means of antibodies against glutamate decarboxilase. Neuroscience 6:785-895.
- 56- Mugnaini, E., y Dertel, W. H., An Atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat central CNS as revealed by GAD immunocytochemistry. in Bjorklund A., Hokfelt, T. (eds) Handbook of Chemical Neuroanatomy. Elsevier, Amsterdam.
- 57- Hokfelt, T., Millhorn, D., Serogy, K., Tsuruo, Y., Ceccatelli, S., Meister, B., Melander, T., Schalling, M., Bartfai, T., y Terenius, L. (1987) Coexistence of Peptides with classical neurotransmitters. Experientia 43:768-779.
- 58- Peria-Velasco, A., Martinez, M., D., Rubio, D., F., (1986) Epilepsia : Un Enfoque Multidisciplinario. Trillas. Mexico
- 59- Milhorat, T., H., Hammock, M. K., (1983) Cerebrospinal-Fluid as reflection of internal Milieu of Brain. en neurobiology of cerebrospinal fluid vol. 2 (Wood, J. H. ed) pp 1-23 Plenum Press, New York.
- 60- Wood J., H., (1983) Physiology, Pharmacology, and Dynamics of

Cerebrospinal-Fluid vol. 1 (Wood, J. H. ed) pp 1-16 Plenum Press, New York.

- 61- Sato, O, Bering, E., A., (1967) Extraventricular-Formation of cerebrospinal-fluid Brain nerve 19:883-885
- 62- Cutler, R. W. P. Page, L. K., Galicich, J., Watters, G.,V., (1968) Formation and absorption of cerebrospinal Fluid in man Brain 91 : 707-720
- 63- Rapoport, S., I., (1975) The Blood-brain barrier in Physiology and Medicine. New York, Raven Press pp 43-86
- 64- Martin, J. H., (1989) Neuroanatomy text and atlas. Elsevier. New York.
- 65- Haegeler, K. D., Schwartz, J.-J., Schoun, J., Schmidt, A. H., y Schechter, P. J. (1987) 2-Pyrrilidinone in Human cerebrospinal fluid : A major constituent of total γ -Aminobutyric acid. J. Neurochem. 49:1402-1406.
- 66- Wood, J. H., Hare, T. A., Glaeser, E. S., Ballenger, J. C, y Post, R. M. (1979) Low cerebrospinal fluid γ -aminobutyric acid content in seizure patients. Neurology 29:1203-1208.
- 67- Bholen, P., Schechter, P. J., Van Damme, W., Coquillat, G., Dosch, J.-C., Koch-Weser, J. (1978) Automatic Assay of gamma-aminobutyric acid. Clin. Chem. 24:256-260.
- 68- Grove, J., Schechter, P. J., Hanke, N. F. J., Smet, Y., Agid, Y., Tell, G. y Koch-Weser, J. (1982) Concentrations gradients of free and total γ -Aminobutyric acid and Homocarnosine in Human CSF : Comparison of suboccipital and lumbar sampling.

J. Neurochem. 39:1618-1622.

- 69- Loscher, W. (1979) GABA in plasma and cerebrospinal fluid of different species. Effects of γ -acetylenic GABA, γ -vinyl GABA and sodium valproate. J. Neurochem. 32:1587-1591
- 70- 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.
- 71- Grossmann, M. H., Hare, T. A., Manyam, N.V.B., Glasesser, B. S. y Wood, J. H. (1980) Stability of GABA levels in CSF under various conditions of storage. Brain Res. 182:99-106.
- 72- Ferraro, T. N., Manyam, B. M. y Hare, T. H. (1983) Further characterization of in vitro conditions appropriate for GABA determination in human CSF: impact of acid desproteinization and Freeze/Thaw. J. Neurochem. 41:1057-1064.
- 73- Roberts, E. (1986) Failure of GABAergic inhibition : a key to local and global seizures. Adv. Neurology. 44:319-341.
- 74- Tapia, R., Pérez de la Mora, M., Massieu, G. H. (1969) Correlative changes of pyridoxal kinase piridoxal-5'-Phosphate and glutamate decarboxilase in brain, during drug-induced convulsions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 166:257-266.
- 75- Hunt, A. D., Stokes, J., McCrory, W. W. y Stroud, H. H. (1954) Pyridoxine dependency : report of a case of intractable convulsions in an infant controlled by pyridoxine. Pediatrics. 13:140-145.
- 76- McGeer, P.L., y McGeer, E.G. (1976) Enzymes associated with

- the metabolism of catecholamines acetylcholine and GABA in human controls and patients with Parkinsons disease and Huntington's Chorea. J. Neurochem. 26:65-76.
- 77- Hornykiewicz, O., Lloyd, K.G., Davidsson, L. (1976) The GABA system, function of the basal ganglia, and Parkinson's disease. En : GABA en Nervous system function. Roberts, E., Chase, T. N., y Tower, D. B. eds.) Raven Press, New York. pp 476-485.
- 78- Bird, E. D., Mackay, A. V. F., Rayner, C. R., y L. L. Iversen (1990) Reduced Glutamic acid-decarboxilase activity of postmortem brain in Huntington's Chorea. Lancet 1:1090.
- 79- Sedman, A. J., Gilmet, G. F., Sayed, A. J., y Posvar, E. L. (1990) Initial human safety and tolerancy study of a GABA uptake inhibitor, CI-966. Potential role of GABA as a mediator in the pathogenesis of schizophrenia and mania. Drug development Research 21: 235-242.
- 80- Carlsson, A. (1988) The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. Neuropsychopharmacology. 1:179-196.
- 81- Lloyd, K. G., Thuret, F., y Pilc, A. (1986) GABA and the mechanism of action of antidepressant drugs. En : GABA and mood disorders : Experimental and clinical research L.E.R.S. (Bartholini, G., Lloyd, K. G., y Morselli, P. L. eds.) vol. 4 Raven Press New York. pp. 33-42.
- 82- Roberts, E. (1977) The γ -aminobutyric acid system and schizophrenia. En : Neuroregulators and Psychiatric disorders.

- (Usdin, E., Hamburg, D. A. y Barches, J. D. eds.) pp. 347-357.
Oxford University Press New York.
- 83- Welch, K. M. A., Chabi, E., Bartosh, K., Achar, V. S., Meyer, J. S. (1975) Cerebrospinal fluid GABA levels in migraine. Brit. Med. Jour. 3:516-517.
- 84- Enna, S.J., Snyder, S.H. (1974) A simple, sensitive and specific radioreceptor assay for endogenous GABA in brain tissue. J. Neurochem. 26:221-224.
- 85- Fricke, U. (1975) A new scintillation cocktail based on Triton X-100. Anal. Biochem. 63:555-558.
- 86- Tower, D. B. (1976) GABA and seizures : clinical correlates in man. En: GABA in Nervous System Function. (E. Roberts, Chase, T. N., y Tower, D. B. eds.) New York. Raven Press. pp. 461-478.
- 87- Hare T.A., y Manyam, N. V. B. (1980) Rapid and sensitive ion-exchange fluorometric measurement of γ -aminobutyric acid in physiological fluids. Anal. Biochem. 101:349-355.
- 88- Manyam, N. V. B., Hare, T. A., Katz, L. (1979) Cerebrospinal fluid GABA levels in Huntington's disease, "at risk" for Huntington's disease and normal controls Adv. Neurol. 23:547-556.
- 89- Wood, J. H., Glaeser, B. S., Enna, S. J., y Hare, T. A. (1978) Verification and quantification of GABA in human cerebrospinal fluid. J. Neurochem. 30:291-293.
- 90- Manyam, V. B., y Trembley, R. D. (1984) Free and conjugated

- GABA in human cerebrospinal fluid : effect of degenerative neurologic disorders and isoniazid. Brain Res. 307:217-223.
- 91- Crawford, P. M., y Chadwick, D. W. (1987) GABA and aminoacid concentrations in lumbar CSF in patients with treated and untreated epilepsy. Epilepsy Res. 1:328-338.
- 92- Araki, K., Harada, M., Ueda, Y., Takino, T., Kuriyama, K. (1989) Alteration of amino acid content of cerebrospinal fluid from patients with epilepsy. Acta Neurol. Scand. 78:473-479.
- 93- Bruni, J., y Wilder, B. J. (1979) Valproic acid Review of a new Antiepileptic drug. Arch. Neurol. 36:393-398.
- 94- Bonnet, A. M., Tell, G., Schechter, F. J., Grove, J., Saint-Hilaire, M. H., De Smet, Y., y Agid, Y. (1987) Cerebrospinal Fluid GABA and homocarnosine concentrations in patients with Friedreich's ataxia, Parkinson's disease and Huntington's chorea. Mov. Disord. 2:117-123.
- 95- Enna, S. J., Stern, L. Z., Wastek, G. J. y Yamamura (1977b) Cerebrospinal fluid γ -aminobutyric acid variations in neurological disorders. Arch. Neurol. 34:683-685.
- 96- Manyam, N. V. B., Katz, L., Hare, T. A., Gerber, J. C. y Grossman, M. H. (1980) Levels of gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid in various neurologic disorders. Arch. Neurol. 37:352-355.