

03062



**FALTA DE ACOPLAMIENTO ENTRE LA
LIBERACIÓN Y LA SÍNTESIS DE GABA A TRAVÉS
DE LOS RECEPTORES GABA_B EN EL CEREBRO DE
LA RATA**

**Tesis presentada por el Biol. Exp.
Alejandro Aguilar García
Para obtener el grado de
Maestro en Investigación Biomédica Básica**

Comité tutorial

Dr. Miguel Pérez de la Mora

Dra. Roció Salceda Sacanelles

Dr. Armando Gómez Puyou

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alejandro Aguilar
García

FECHA: 6 de Enero de 2004

FIRMA: Aguilar García Alejandro

A mis padres y hermanos.

A mis Tutores.

Al Doctor Miguel Pérez de la Mora, que siempre ha creído en mí y a quien espero nunca defraudar.

A mis amigas y compañeras del Instituto de Fisiología Celular, Ana, Naty, Tere, Minerva, Berta, Elizabeth.

A Sandy y Marce, dos hermanas que me brindaron siempre su amistad y me ayudaron a superar momentos muy difíciles.

A mi esposa, Sandra Ivonne, que me impulsó a terminar esta tesis y finalmente obtener un título largamente esperado.

Resumen

El ácido γ -aminobutírico (GABA) se sintetiza en las terminales nerviosas gabaérgicas a través de un proceso altamente compartimentalizado, en el cual la glutamina derivada de la glia es su principal precursor y su liberación es modulada por los autorreceptores GABA_B. El objetivo de este trabajo fue estudiar si la síntesis de GABA esta acoplada o no con la regulación de su liberación es modulada por receptores presinápticos, entre ellos, los autorreceptores GABA_B. Se encontró que el (-)baclofen (30 μ M) reduce la liberación de [³H]GABA estimulada por K⁺ en sinaptosomas y prismas (10 μ M) de corteza cerebral, mientras que las mismas concentraciones de (-)baclofen no modificaron la síntesis de [³H]GABA proveniente de glutamina en rebanadas corticales e hipotalámicas, así como tampoco en prismas y sinaptosomas corticales. En esta última preparación, se encontraron resultados idénticos a los anteriores cuando el (-)baclofen fue añadido al medio Krebs-Tris conteniendo K⁺ 5 o 15 mM. Resultados similares sobre la síntesis de GABA se observaron cuando se usó el ácido 3-Aminopropil(metil)fosfínico 1-100 μ M en lugar del (-)baclofen para estimular a los autorreceptores GABA_B. La liberación del [³H]GABA y la síntesis del mismo proveniente de [³H]glutamina fueron también insensibles a la acción del antagonista de los receptores GABA_B, el CGP 52432 (10-100 μ M). De igual forma, el muscimol (un agonista GABA_A) en concentraciones que fueron de 0.3 a 100 μ M tampoco afectó la síntesis de GABA. Nuestros resultados indican que a diferencia de la liberación de GABA, su síntesis no es modulada por los autorreceptores GABA_B.

Introducción

El GABA es el neurotransmisor inhibitor más abundante en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. Su liberación es regulada por autorreceptores. En otros sistemas de neurotransmisores como el dopaminérgico, los autorreceptores D₂ son capaces de regular la síntesis de dopamina además de su liberación. Esto es algo que podría estar pasando también en el sistema GABAérgico, por ello es que en este trabajo exploramos la posibilidad de que la síntesis de GABA sea regulada a través de los mismos autorreceptores que regulan su liberación.

Las células nerviosas presentan dos propiedades que las distinguen del resto de las células animales. Primero, éstas células pueden conducir señales bioeléctricas a través de largas distancias sin pérdida en la fuerza de la señal. La segunda propiedad que las hace diferentes, es que establecen conexiones con otras células nerviosas y con células de otros tejidos como músculos y glándulas (Cooper et al.1996). Las conexiones que se establecen entre las neuronas son denominadas sinapsis y pueden ser eléctricas o químicas. Las sinapsis eléctricas se forman por proteínas que conectan a las células nerviosas entre sí formando uniones comunicantes (gap junction) que permiten el paso de iones de una célula a la otra propiciando una comunicación celular muy rápida (Kandel, et.al. 1991).

En las sinapsis químicas, por su parte, se encuentran moléculas (neurotransmisores) que son liberadas desde la presinapsis y que actúan en la célula postsináptica por medio de proteínas receptoras específicas para cada molécula. Los neurotransmisores son de muy diversa naturaleza química, ya que pueden ser desde aminoácidos, como en el caso del ácido γ -aminobutírico (GABA), aminas, como la dopamina y la serotonina, péptidos como las encefalinas, moléculas sencillas como el óxido nítrico, o incluso lípidos como el ácido araquidónico. (Cooper, et.al., 1996, Schwartz, 1991a).

Para que un neurotransmisor sea considerado como tal, debe cumplir ciertos requisitos. La molécula de que se sospecha su función como neurotransmisor debe estar presente en la sinapsis donde se cree que se libera. Esta molécula debe ser metabolizada localmente y liberada por despolarización de las terminales que lo usan como neurotransmisor. Al ser exógenamente aplicada, la sustancia neurotransmisora deberá mimetizar los efectos de la molécula endógena y deberá contar con receptores postsinápticos de alta afinidad. Otro criterio de identificación de un transmisor sináptico, es que su efecto debe ser antagonizado por fármacos que bloqueen la acción de dicha molécula. Un último criterio, pero no por ello menos importante, es que la molécula neurotransmisora debe de ser inactivada o eliminada de su zona de acción en el rango de los milisegundos (Pérez de la Mora, 1995, Cooper et al., 1996).

La comunicación neuronal permite desde la regulación de las funciones nerviosas autónomas (por ejemplo las cardiovasculares), hasta la modulación de conductas tan complejas como la memoria. Los neurotransmisores son un factor muy importante dentro de esta comunicación celular, ya que como su nombre lo indica, llevan la información de una célula a otra y de esta forma hacen posible la comunicación entre diferentes regiones del sistema nervioso y la comunicación entre el sistema nervioso y otros tejidos excitables como el músculo.

La comunicación a través de neurotransmisores está altamente regulada, pues depende de la afinidad de los receptores por éstos, de su capacidad para mantenerse activos y de los mecanismos de señalización, que pueden usar para transducir su mensaje. Por otro lado, la liberación del neurotransmisor y su regulación dependen de diversos factores entre los que se encuentran el grado de excitabilidad de la neurona que los libera y la ocupación de hetero o autorreceptores presentes en la presinapsis.

La síntesis de los neurotransmisores también es un factor importante dentro de la comunicación neuronal y, al igual que la liberación, puede ser modulada por medio de autorreceptores ubicados en la presinapsis. Un claro ejemplo de esto, es la regulación de la síntesis de dopamina, en la cual la enzima tirosina hidroxilasa es regulada por medio de procesos de fosforilación-defosforilación promovidos por la estimulación de los mismos autorreceptores que regulan su liberación (Elsworth y Roth, 1997, Goldstein, 1995).

El proceso anterior también podría darse en el caso del sistema gabaérgico y quizás en el de todos los sistemas aminoacídicos, pues al menos en el caso del sistema gabaérgico, en donde la liberación del GABA se modula por autorreceptores, a la manera de la liberación de dopamina, la fosforilación-defosforilación de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), que sintetiza al GABA, parece regular también la síntesis de este neurotransmisor (Bao et. al. 1995). Resulta tentador en consecuencia, preguntarse si este acoplamiento mediado por autorreceptores, es un mecanismo general o tan solo una peculiaridad de los sistemas aminérgicos.

Receptores.

Como se señaló antes, uno de los requisitos para que una molécula sea considerada como neurotransmisor es que debe de contar con receptores de alta afinidad. Estos receptores son proteínas que permiten la transducción de los mensajes enviados a una célula. Cada sistema de neurotransmisión cuenta con receptores específicos para el tipo de transmisor utilizado en dicho sistema. Estos receptores se han dividido en dos grandes familias con base en sus estructuras moleculares y en las vías que usan para transducir su señal. Así, los receptores ionotrópicos están formados por un complejo de cinco subunidades y cada una de éstas posee cuatro segmentos transmembranales. El arreglo de las subunidades permite la formación de un canal por el cual transitan iones específicos de un lado a otro de la membrana. Cuando el neurotransmisor se une a su sitio receptor sobre una de las subunidades, la conformación de las subunidades cambia en su conjunto para permitir entonces la apertura del canal (Kandel, et. al., 1991). Diversos sistemas de neurotransmisores poseen este tipo de receptores, como el glutamatérgico, que posee receptores que por unirse al ácido N-metil-D-aspartato, se denominan receptores NMDA y que son selectivos para Ca^{2+} y Na^+ , así como los receptores AMPA-Kainato (que responden tanto al AMPA como al ácido kaínico) y son selectivos para el Na^+ . Los receptores nicotínicos, que reconocen a la acetil colina, están asociados a un canal selectivo para Na^+ , mientras que los receptores GABA_A son selectivos para el Cl^- (Edwards, et. al., 1990, Kuriyama, et al., 1993).

Otro tipo de receptores, los metabotrópicos, están formados por una proteína que posee siete segmentos transmembranales y que pueden unirse por su extremo carboxilo terminal a proteínas que unen GTP (proteínas G), y que son las encargadas de transducir la información que lleva el neurotransmisor al interior de la célula (Shwartz y Kandel, 1991).

Las proteínas G son proteínas heterotriméricas de las cuales la subunidad α es la responsable de su unión al GTP, así como de estimular o inhibir a otras proteínas efectoras del tipo de la adenilato ciclasa (Kebabian, 1992). Por su parte, el complejo $\beta\gamma$, formado por las subunidades β y γ puede a su vez interactuar con sus propios efectores y regula la

apertura de canales iónicos (Neer, 1995; Kajikawa, et. al., 2001). Existen varias familias de proteínas G entre las que se encuentran las denominadas G_s . Dichas proteínas estimulan a la enzima adenilato ciclasa, y son sensibles a la toxina del cólera, aumentando así la producción de AMP_C , además de activar a algunas fosfolipasas. Estas proteínas G_s también son capaces de regular la apertura de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. Otro tipo de proteínas G denominadas G_i , inhiben al igual que las proteínas G_o a la adenilato ciclasa y son sensibles a la toxina pertusis y regulan la apertura de canales de K^+ y Ca^{2+} (Nerr, 1995). Entre los receptores que se asocian con proteínas G se encuentran los receptores β -adrenérgicos, capaces de activar principalmente a las prot. G_s , aunque también pueden activar a las del tipo G_i , mientras que los receptores α -adrenérgicos activan únicamente prot. G_i . La acetil colina, a través de sus receptores muscarínicos, también puede activar tanto a proteínas G_i como a las de tipo G_q (Nerr, 1995). Los receptores D_2 para la dopamina son capaces de activar a la prot G_i , mientras que los receptores D_1 activan a la adenilato ciclasa a través de proteínas G_s (Kebabian, 1992).

En el caso del sistema gabaérgico, los receptores $GABA_B$ se encuentran acoplados a proteínas G_i o G_o , por lo cual, al activarse, son capaces de inhibir a la adenilato ciclasa (Hashimoto y Kuriyama, 1997b; Nishikawa, et al, 1997). Estos receptores pueden localizarse tanto pre como postsinápticamente y presentan en cada caso funciones diferentes. Los receptores $GABA_B$ postsinápticos inhiben a la célula que los posee por medio de una hiperpolarización provocada merced a la apertura de canales de potasio que da lugar a una corriente saliente de este ion (Gähwiler y Brown, 1985; Obrocea y Morris, 1998, Wang, et al 2000). Los receptores $GABA_B$ presinápticos regulan la apertura de los canales de Ca^{+2} ubicados en la terminal sináptica, inhibiendo con esto la liberación de los neurotransmisores (Santos, et al, 1995; Takahashi, et al 1998; Barral, et al; 2000), y activan la apertura de canales para K^+ (Yamada et .al. 1999; Wang et. al. 2000).

Es importante señalar que aparte de funcionar postsinápticamente y en consecuencia ser activados por el neurotransmisor que lleva un mensaje de una célula a otra, algunos receptores denominados autorreceptores, son activados por el neurotransmisor liberado y están localizados en la misma terminal que los libera. Estos autorreceptores son, en su

mayor parte, si no es que en su totalidad, receptores metabotrópicos que requieren para su acción de diversos tipos de acoplamientos y de acciones intracelulares que varían en complejidad para cada uno de ellos. (Langer; 1981, Brock, 1995; Langer, 1997. Véase sin embargo: Floran et al., 1988).

Liberación de Neurotransmisores.

Las moléculas neurotransmisoras se localizan dentro de vesículas en la terminal sináptica evitando de esta forma su degradación. La liberación de los neurotransmisores provocada por la despolarización de la terminal presináptica se da por medio de un proceso excitotóxico a través del cual las vesículas sinápticas liberan su contenido al espacio sináptico. Este proceso de liberación depende de la entrada de Ca^{2+} a la terminal nerviosa. Dicha entrada se realiza a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje ubicados muy cerca de los sitios de liberación (Schwartz, 1991b; Kelly, 1993; Katz, 1996). Así, una disminución en la entrada de Ca^{2+} a las terminales presinápticas provocaría una disminución en la liberación de los neurotransmisores.

La entrada de Ca^{2+} a la terminal sináptica permite la activación de la enzima proteína cinasa II dependiente de calmodulina (Sitges, et al., 1994). Esta cinasa fosforila a una proteína vesicular involucrada en el proceso de liberación, denominada sinapsina I. La sinapsina I, es responsable de mantener a las vesículas sinápticas ancladas al citoesqueleto; sin embargo, cuando esta proteína se encuentra fosforilada pierde esta capacidad permitiendo que las vesículas sinápticas viajen al sitio de la liberación del neurotransmisor. Otra proteína vesicular que aparentemente es importante en la liberación de neurotransmisor dependiente de Ca^{2+} es la sinaptotagmina, la cual, además de unirse al calcio, parece ser la responsable de acoplar a las vesículas sinápticas con los canales de Ca^{2+} en el sitio de liberación del neurotransmisor, lo que permite la rápida liberación de estas moléculas. Se desconoce, sin embargo, la labor que desempeñan algunas otras proteínas vesiculares como es la sinaptofisina, que al igual que la sinaptotagmina se une también al Ca^{2+} (Schwartz, 1991b, Burgoyne y Cheek, 1995).

Además de las proteínas que se localizan en las membranas de las vesículas sinápticas, se han involucrado proteínas solubles como la p145, la annexina II, y las Exo I y Exo II. Llama la atención que esta última proteína tiene una secuencia de aminoácidos similar a la del sitio catalítico de la enzima protein cinasa C y que la activación de ésta enzima incrementa la liberación de neurotransmisores estimulada por las proteínas Exo I y p145 (Burgoyne y Cheek, 1995).

Regulación de la liberación de los neurotransmisores.

La modulación de la liberación de un neurotransmisor puede darse a varios niveles, esto es, puede ser regulada por la frecuencia y el número de los impulsos nerviosos que llegan a la terminal de donde se liberan, así como por la naturaleza de estos impulsos. De esta manera, un mayor número de impulsos inhibidores ocasionaría que la neurona blanco no liberase o dejase de liberar a su neurotransmisor, mientras que el predominio de los impulsos excitadores provocaría la acción opuesta. Estos impulsos pueden provenir de neurotransmisores liberados presinápticamente o de neurotransmisores liberados a distancia pero que pueden llegar a sus receptores a través del espacio extracelular (Stjärne, et.al., 1995; Fuxe and Agnati, 1991).

Por otro lado, una neurona puede autorregular, la liberación de su neurotransmisor por medio de autorreceptores presentes en la misma célula y que reconocen al neurotransmisor liberado por dicha neurona. Tales autorreceptores modulan la liberación de sus propios neurotransmisores, incrementando (autorreceptores excitadores) o inhibiendo (autorreceptores inhibidores) su propia liberación y han sido descritos para diferentes sistemas entre los que destacan los sistemas noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico, glutamatérgico y gabaérgico (Langer; 1981, Brock, 1995; Langer, 1997).

El sistema noradrenérgico cuenta con ambos tipos de autorreceptores, siendo los autorreceptores α_2 -adrenérgicos los responsables de la inhibición en la liberación de noradrenalina, mientras que los autorreceptores del tipo β_2 -adrenérgicos facilitan la liberación del mismo neurotransmisor (Langer, 1981, Langer 1997).

Por otro lado, el sistema colinérgico también cuenta con autorreceptores excitadores e inhibidores. En ambos casos parecen estar involucrados receptores nicotínicos, los cuales se diferencian en su distribución a través de la terminal sináptica, esto es, los autorreceptores nicotínicos excitatorios aparentemente se localizan cerca de los sitios de liberación mientras que los inhibidores se encuentran un poco más alejados de ellos (Brock, 1995) . Los receptores muscarínicos M_2 también se han catalogado como autorreceptores e inhiben la liberación de la acetil colina (Baghdoyan, et. al., 1998, Langer, 1997).

Así mismo, los autorreceptores que modulan la liberación de serotonina son inhibidores y al parecer realizan esta inhibición en forma tónica, ya que la presencia de antagonistas de estos receptores aumenta por sí sola la liberación de este neurotransmisor. Esta modulación de la liberación de serotonina parece ser llevada a cabo por receptores $5-HT_{1B}$ y $5-HT_{1D}$ dependiendo de la especie (Limberge, et.al., 1989; Sprouse, et.al., 1997), aunque también cuentan con un autorreceptor excitador que pertenece al subtipo $5-HT_3$ (Langer, 1997).

En el caso del sistema dopaminérgico, los autorreceptores para la dopamina no solo inhiben la liberación del neurotransmisor, sino que también inhiben la síntesis de este. Los autorreceptores presinápticos dopaminérgicos son del tipo D_2 e inhiben la síntesis de dopamina por medio de la fosforilación de la enzima tirosina hidroxilasa, que es la enzima que limita la velocidad de la síntesis de las catecolaminas y que se inhibe al ser fosforilada (Brock 1995; Goldstein, 1995; Elsworth, et.al. 1997). Los receptores D_3 también han sido descritos como autorreceptores inhibidores, y de hecho se piensa que estos autorreceptores son los responsables de inhibir la liberación de dopamina mientras que los autorreceptores D_2 , a través de vías de transducción diferentes, son los responsables de inhibir la síntesis del neurotransmisor (Goldstein, 1995; Langer, 1997, O'Hara et.al., 1996).

SISTEMA GABAÉRGICO

El sistema gabaérgico cuenta también con autorreceptores presinápticos que inhiben la liberación del GABA. Estos autorreceptores pueden ser tanto del tipo GABA_A (Floran et al 1988) como del tipo GABA_B (Langer, 1997) e inhiben la liberación del neurotransmisor por medio del cierre de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Thompson y Gähwiler, 1992; Misgeld et al., 1995). Se desconoce, sin embargo, si estos receptores pudieran también modular la síntesis del GABA.

Síntesis de GABA.

El GABA es sintetizado por la GAD a partir de glutamato. La GAD es una enzima homodimérica que se localiza únicamente en las neuronas gabaérgicas y que cuenta con dos isoformas de diferente peso molecular la GAD₆₅ y GAD₆₇. Cada isoforma es codificada por un gene diferente (Erlander y Tobin, 1991; Wu, et.al., 1991; Suzuki, et al., 1995) y varían entre sí en algunos aspectos. Las dos isoformas usan al fosfato de piridoxal (PLP) como cofactor, sin embargo, la GAD₆₇ tiene una mayor afinidad por el PLP que la GAD₆₅, por lo que a las concentraciones intracelulares de PLP. Esta última se encuentra básicamente como GAD inactiva. De hecho, en presencia de PLP la GAD₆₅ aumenta 7 veces su actividad, mientras que la GAD₆₇ aumenta únicamente 2 veces. La distribución de la GAD dentro de las células gabaérgica es diferente para ambas enzimas, la GAD₆₅ se localiza unida a membranas y la mayor concentración de esta enzima dentro de las células se da en las terminales, mientras que la GAD₆₇ que es una proteína soluble se encuentra homogéneamente distribuida a todo lo largo de la neurona (Erlander y Tobin, 1991).

Se ha encontrado adicionalmente que la actividad de la GAD y por tanto la síntesis de GABA puede ser regulada por aspartato (Porter y Martín, 1987; Battaglioli, et.al. 2003), ATP (a través de procesos de fosforilación-defosforilación, Bao, et. al., 1995; Battaglioli, et.al. 2003), y GABA (Porter y Martín, 1984; Rinvall y Martín, 1992; Battaglioli, et.al. 2003). Una disminución en la concentración del glutamato usado por la GAD como sustrato

permite la separación del PLP de la enzima con lo que esta pasa de un estado activo (holoGAD) a uno inactivo (apoGAD, Martin y Martin, 1979; Battaglioli, et.al. 2003).

El ATP, al igual que otros nucleótidos trifosfatados, inhibe competitivamente la activación de la GAD por PLP, impidiendo la formación de holoGAD (Martin y Martín, 1979; Martín y Martín, 1982). Esta inhibición de la GAD por ATP parece estar dada por una fosforilación de la GAD realizada por la enzima proteína cinasa A (PKA), ya que el inhibidor específico de PKA (PKI), bloquea la fosforilación de la GAD impidiendo así la inhibición de esta (Martín y Martín, 1982). El ácido ocádaico inhibe la actividad de la calcineurina, una protein-fosfatasa dependiente de Ca^{2+} (Jouvenceau, et.al 2003). que evita la defosforilación de la GAD manteniendo así su inhibición (Bao et. al., 1995). Estos datos indican que la GAD pudiera estar regulada por ciclos de fosforilación (inhibición) y defosforilación (activación) estando posiblemente involucradas en estos procesos las enzimas PKA y calcineurina. Por otro lado, la formación de holoGAD no se da solo por la presencia de PLP y glutamato, ya que es necesaria la presencia de P_i , para permitir la unión de la GAD a su cofactor (Martin y Martín, 1979).

Se ha observado que el GABA (5-15 mM) es capaz de disminuir la actividad de la GAD a concentraciones que caen dentro de los niveles (50 a 150 mM) reportados en las terminales sinápticas gabaérgicas. (Martin y Rimvall, 1993; Fonnum y Walberg, 1973) en presencia de ATP (Porter y Martín, 1984). El uso de γ -vinil GABA (GVG), un inhibidor de la enzima GABA- α -cetoglutarato transaminasa (GABA-T), responsable de la degradación del GABA, permite un aumento en la concentración de GABA dentro de neuronas en cultivo con lo cual se ha observado también una inhibición en la actividad de la GAD (Rimvall y Martín, 1992). Otra evidencia que apoya la regulación de la actividad de la GAD por el GABA, es el hecho de que en el llamado “síndrome de abstinencia al GABA”, producido por la administración intracerebral de altas concentraciones de GABA, la actividad de la GAD medida en homogenados corticales disminuye entre el 27 y el 47% (Salazar, et. al., 1994). Resultados similares fueron observados cuando GVG se inyectó por 7 días consecutivos en ratas. Bajo estas condiciones los niveles de GABA aumentaron 2.3 veces y la actividad de la GAD disminuyó en un 30 % en la corteza cerebral, mientras que

los niveles de la proteína GAD₆₇ pero no los de la GAD₆₅, disminuyeron entre el 75 y 80 % (Rimvall et. al. 1993). De hecho, un ligero incremento en los niveles de GABA inducido por GVG en ratas, disminuyó cerca del 12% los niveles de GAD₆₇ en sinaptosomas de corteza cerebral (Rimvall y Martin 1994).

Por otro lado, estudios realizados en sinaptosomas han mostrado que los niveles del GABA dentro de las terminales sinápticas gabaérgicas se mantienen constantes a pesar de un incremento en su liberación (Martin y Rimvall, 1993), indicando que existe un buen acoplamiento entre la liberación y la síntesis del GABA, y que debe en consecuencia sintetizarse GABA para mantener los niveles estables de este neurotransmisor durante los periodos de su liberación (Gomez-Lira et. al. 2002) . En conjunto estos datos apoyan la idea de que el GABA podría regular su propia síntesis adecuándola a las necesidades que le impone su liberación.

El GABA como ya se ha mencionado anteriormente se sintetiza a partir del glutamato, sin embargo, dicho glutamato proviene de la aminación del α -cetoglutarato por acción de la enzima aspartato-amino transferasa (AAT)) (Pérez de la Mora, 1995; Shank y Campbell, 1983) por otro lado, la glutamina, gracias a la actividad de la enzima glutaminasa dependiente de fosfato (PAG), es transformada a glutamato (Shank y Campbell, 1983). La AAT cuenta con dos isoformas (Fig. 1), una citoplasmática (AAT_s) y una mitocondrial (AAT_m) (Kaneko y Mizuno, 1994; Fonnum, 1993). Dichas isoformas no tienen una localización regional específica en el cerebro; sin embargo, se ha sugerido que la AAT puede ser un marcador de las células glutamatérgicas, aunque en la corteza cerebral se ha podido observar que las células gabaérgicas presentan una actividad de AAT mayor que la que exhiben las células glutamatérgicas dentro de la misma zona. De las dos isoformas antes descritas se ha visto que la forma mitocondrial es inhibida por el oxaloacetato (Fonnum, 1993).

Por su parte, la PAG se encuentra localizada en las mitocondrias (Kvame, et al., 1991) estando, en algunos casos, más concentrada en las terminales glutamatérgicas y gabaérgicas. Como su nombre lo indica, la PAG se activa por fosfato, además de varios

ácidos carboxílicos y de Ca^{2+} , y es inhibida por el glutamato, los iones amonio y los protones. La concentración de glutamina observada en las terminales gabaérgicas de cerebelo fue de 5-18 mM (Ottersen et. al; 1992) y la K_m de la PAG para glutamina está en el rango mM, por lo que la actividad de la enzima *in vivo* pudiera depender de la concentración de glutamina en dichas terminales. (Fonnum, 1993).

Por lo que respecta a la regulación de la PAG, es importante señalar que la concentración normal de fosfato es de 1-2 mM dentro de las neuronas, pero esta se incrementa rápidamente durante la actividad neuronal a consecuencia de la hidrólisis de ATP (Fonnum, 1993). Por su parte, el Ca^{2+} incrementa la formación de glutamato en sinaptosomas, pero no tiene un efecto directo sobre la PAG (Benjamin, 1981; Kvamme et. al, 1983). Sin embargo, como ya se ha descrito anteriormente, la elevación en la concentración de Ca^{2+} en la terminal sináptica aumenta la liberación de los neurotransmisores como es el caso del glutamato. Esta liberación sináptica de glutamato pudiera ser entonces la que provocara el aumento de la actividad de la PAG, ya que la inhibición de ésta enzima por el mismo glutamato se haría menos aparente, compensando así la reducción en la concentración del glutamato (Benjamin, 1981; Fonnum, 1993).

Por otro lado, el glutamato es metabolizado por la AAT que lo transforma en α -cetoglutarato, y por la glutamino sintetasa, una enzima predominantemente glial, que lo convierte en glutamina. Esta glutamina al igual que el α -cetoglutarato podrían ser utilizados nuevamente para la síntesis del glutamato (Fig. 1., (Fonnum, 1993)).

La síntesis de glutamato se encuentra compartimentalizada (Schousboe, et.al., 1997) es decir, en el tejido cerebral existe más de una poza o compartimento metabólico de glutamato. Así, se ha observado que al ser inyectado GABA marcado radiactivamente dentro del cerebro, la actividad específica para la glutamina es mayor que la de su precursor, el glutamato. Esto mismo ocurre al administrar glutamato marcado. Como explicación a estos hechos se ha invocado la compartimentalización del glutamato dentro del tejido. De acuerdo con esto, existirían dos pozas metabólicas de glutamato, una poza grande y una pequeña. Dichas pozas se comunicarían metabólicamente pero se

equilibrarían entre sí muy lentamente, sin embargo, la poza pequeña se equilibraría rápidamente con la glutamina del tejido (Fonum, 1993 y Kaneko y Mizuno, 1994). Al inyectar intracisternalmente glutamato y glutamina marcados en cerebros de rata se encontró una actividad específica para el GABA mayor que la del glutamato. Esto se debe

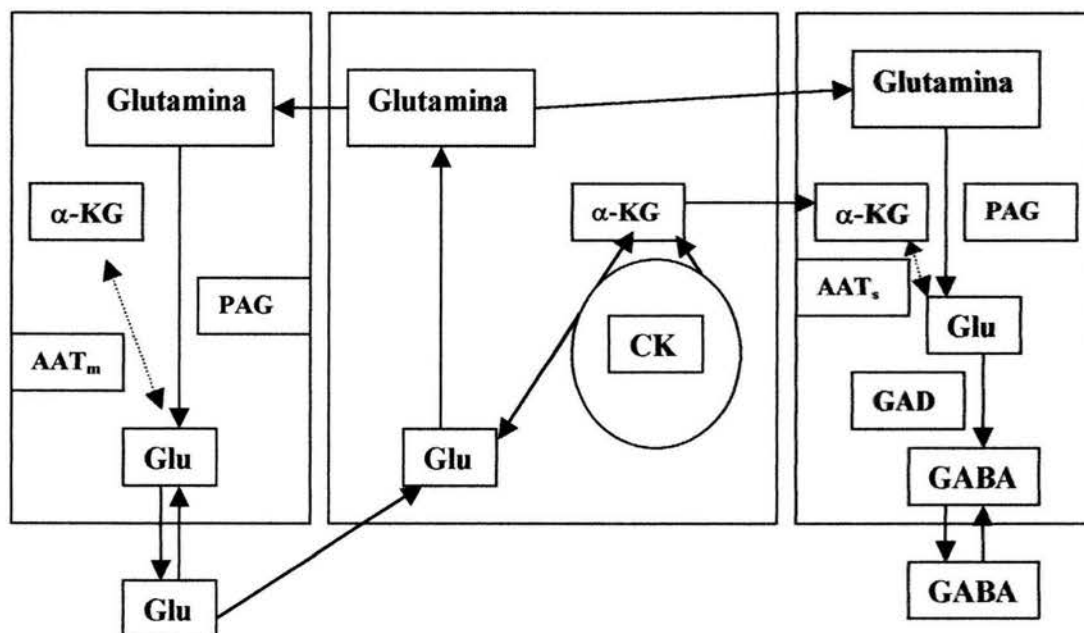


Fig. 1. El esquema muestra el llamado ciclo de la glutamina, y en el se aprecia la compartimentalización de la síntesis del glutamato el cual puede provenir, entre otros precursores, del α -cetoglutarato (α -KG) y de la glutamina. Las flechas con líneas punteadas muestran la vía de síntesis del glutamato "metabólico" y las líneas continuas la síntesis del glutamato destinado a la síntesis de GABA. α -KG= α -cetoglutarato, AAT_m=aspartato aminotransferasa mitocondrial, AAT_s=aspartato aminotransferasa soluble, CK= ciclo de Krebs, GAD=glutamato descarboxilasa, Glu=glutamato, PAG=glutaminasa dependiente de fosfato, GABA=ác. GABA aminobutírico. Tomado y modificado de Kaneko y Mizuno, 1994.

a que el glutamato que es capturado por la glia es transformado a glutamina la cual viaja a las terminales gabaérgicas donde será reconvertido a glutamato (Fig. 1). Dicho glutamato servirá a su vez como precursor del GABA (Baxter 1976). De hecho, se ha observado que la glutamina es un mejor precursor para la síntesis del GABA que el glutamato. Esto se debe a que el glutamato exógeno se diluye en el glutamato total de las células, mientras que la glutamina marca principalmente el glutamato de la poza pequeña, el cual será usado como neurotransmisor o como precursor para la formación de GABA. (Baxter 1976, Paulsen et. al. 1988, Peng et. al. 1993, Sonnewald et. al. 1993). Resultados mas recientes

que apoyan dicha compartimentalización han sido reportados por Schousboe y colaboradores (1997) y Pérez de la Mora y colaboradores (1999).

Receptores gabaérgicos.

El GABA cuenta con tres tipos de receptores diferentes. El primero que se describió fue el receptor ahora denominado GABA_A, que es un receptor ionotrópico asociado a un canal iónico selectivo para el ión cloruro (Cl⁻). El segundo receptor que se describió se denominó GABA_B. Este es metabotrópico y está asociado a proteínas G_i o G_o las cuales inhiben la síntesis de AMP cíclico y regulan la apertura de canales de Ca²⁺ y K⁺ dependientes de voltaje (Wojcik, y Neff, 1983, Hill, 1985; Bowery, 1989). El tercer tipo de receptores se localizó primero en retina y se denominó GABA_C, y al igual que los receptores GABA_A están asociados a un canal iónico selectivo para iones Cl⁻, pero a diferencia de los receptores GABA_A estos están constituidos por 5 unidades ρ (Ragozzino, et.al. 1996, Zhang, et.al. 1995)

La localización y la farmacología de estos dos tipos de receptores son diferentes dentro del sistema nervioso. El receptor GABA_A se localiza principalmente en la postsinapsis, aunque existen reportes de que también se localizan presinápticamente en la sustancia nigra pars compacta (Floran et.al., 1988), en el globus pallidus (Hashimoto y Kuriyama, 1997a) y es selectivamente sensible, entre otros, al muscimol (agonista GABA_A) y a la bicuculina (antagonista GABA_A, Matsumoto, 1989; Kuriyama, et.al., 1993). Los receptores GABA_B se localizan tanto postsináptica como presinápticamente y son sensibles en forma selectiva entre otras sustancias al baclofen y al ácido 3-aminopropil(metil)fosfínico (3-APP) ambos agonistas GABA_B, así como a los antagonistas faclofen y CGP52432 (Misgeld, et.al. 1995; Mott y Lewis, 1994; Ong, et.al., 1998). Los receptores GABA_A son responsables de producir un potencial postsináptico inhibitor rápido por medio de un aumento en las corrientes entrantes de Cl⁻, mientras que los receptores GABA_B provocan un potencial postsináptico inhibitor lento, al aumentar las corrientes salientes de K⁺ cuando se localizan en la postsinapsis (Thompson y Gähwiler, 1992; Mott and Lewis, 1994; Misgeld, 1995). Los receptores GABA_B presinápticos pueden

inhibir la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico estimulada eléctricamente o por alto K^+ , a través del cierre de canales de Ca^{2+} sensibles voltaje (Waldmeier y Baumman, 1990; Thompson y Gähwiler, 1992; Misgeld et.al., 1995; Jensen, et.al. 1999). De la misma forma, éste tipo de receptores presinápticos pueden inhibir la liberación de GABA funcionando como autorreceptores (Raiteri, et.al., 1989; Misgeld et.al., 1995; Pittaluga, et. al., 1987).

Existe evidencia de diferencias farmacológicas entre los receptores $GABA_B$ pre y postsinápticos, que resultan en diferentes sensibilidades para antagonistas como el CGP 35348 y para iones como el Ba^{2+} (Dutar y Nicoll, 1988; Deisz et. al., 1993; Pitler y Alger, 1994; Deisz, et.al., 1997).

Los receptores $GABA_B$ cuentan con dos subtipos denominados $GABA_{BR1}$ y $GABA_{BR2}$, producidos por dos genes diferentes (Bowery y Brown, 1997, Ng et. al. , 1998). La homología entre ambos subtipos es muy alta, sin embargo, los receptores $GABA_{BR2}$ cuentan con un extremo carboxilo terminal más largo que la de los receptores $GABA_{BR1}$ (Jones, et. al., 1998). Los receptores $GABA_{BR1}$ cuentan además con al menos cuatro isoformas reportadas, a saber $GABA_{BR1A}$, $GABA_{BR1B}$, $GABA_{BR1C}$, y $GABA_{BR1D}$ (Isomoto, et. al., 1998, Bowery y Brown, 1997) Los primeros en descubrirse y por los mismo los más estudiados son las isoformas $GABA_{BR1A}$ y $GABA_{BR1B}$. Cada una de estas dos isoformas necesita formar un heterodímero con el receptor $GABA_{BR2}$, para producir un receptor activo (Jones, et. al., 1998; Kaupmann, et. al., 1998; White, et. al., 1998; Kuner, et. al., 1999).

Las isoformas del receptor $GABA_{BR1}$ parecen tener una expresión diferencial en las diferentes regiones del cerebro de la rata (Isomoto et. al., 1998, Möhler, et. al., 2001) e incluso las isoformas $GABA_{BR1A}$ y $GABA_{BR1B}$ están asociadas a elementos pre y postsinápticos respectivamente (Billinton, et. al., 1999). Esto podría explicar las diferencias farmacológicas observadas entre los receptores $GABA_B$ pre y postsinápticos, así como las diferencias entre los receptores $GABA_B$ en varias zonas del SNC.

Dado que los autorreceptores GABA_B inhiben la liberación de GABA, y que la actividad de la GAD es inhibida por su fosforilación y por altas concentraciones de GABA como sucede en el sistema dopaminérgico, en donde la enzima tirosina hidroxilasa, es inhibida tanto por altas concentraciones de dopamina como por su fosforilación, es posible pensar que la síntesis de GABA pudiera ser regulada por la actividad de sus autorreceptores metabotrópicos (GABA_B), en la misma forma que el autorreceptor D₂, metabotrópico, regula la síntesis de la dopamina.

Hipótesis

Existe un acoplamiento entre la síntesis y la liberación de GABA modulado por autorreceptores GABA_B.

Objetivo

Estudiar la posible regulación de la síntesis de GABA a partir de glutamina por sus autorreceptores GABA_B en el cerebro de la rata.

Métodos

Obtención de tejido.

En este trabajo se utilizaron ratas macho albinas de la cepa Wistar de entre 160 y 200 g de peso, las cuales fueron sacrificadas por dislocación de las vértebras cervicales. Los cerebros fueron extraídos rápidamente y colocados en solución salina a 4°C. Las regiones estudiadas fueron disectadas manualmente y se obtuvieron rebanadas de 400 µm o prismas de 400X400 µm con ayuda de un rebanador de tejido McIlwain. Las rebanadas se seleccionaron y se repartieron de dos a tres en cada cámara de incubación. Los prismas se suspendieron en el medio de incubación y alícuotas de 30 µl fueron añadidas a las cámaras de incubación.

Medio de incubación.

El medio que se utilizó para la incubación del tejido fue un medio Krebs-Tris con la siguiente composición (mM): NaCl, 124; KCl, 5; KH₂PO₄, 1.25; MgSO₄, 1.2; Trisma base, 35; glucosa, 10 y CaCl₂, 0.75; pH 7.2. En los ensayos en que se requirieron condiciones despolarizantes, las concentraciones de NaCl y KCl se cambiaron por para ajustar la concentración total de K⁺ a 15 mM. Sin modificar las condiciones osmóticas del medio.

Obtención de sinaptosomas.

Los sinaptomas se obtuvieron por el método descrito por Löscher et al. (1985). En breve, para cada ensayo la corteza frontoparietal de la rata fue obtenida y se homogenizó en un mililitro de sacarosa 0.32 M fría. Los homogenizados se centrifugaron a 1,200 x g por 10 min. Se rescataron los sobrenadantes y se centrifugaron nuevamente a la misma velocidad y por el mismo tiempo. El sobrenadante resultante se colocó sobre 1 ml de sacarosa 1.2 M y se centrifugó a 160,000 x g por 15 min. De esta centrifugación se formaron 3 fases, la fase central fue rescatada con ayuda de una pipeta Pasteur y resuspendida en dos ml de sacarosa 0.32 M. La suspensión se colocó sobre 1 ml de sacarosa 0.8 M y se centrifugó nuevamente a 160,000 x g por otros 15 min. El pellet resultante conteniendo la fracción sinaptosomal fue resuspendido en medio Krebs-Tris pH 7.2 frío. Todas las fracciones sinaptosomales fueron reunidas y llevadas a un volumen de 20 ml para posteriormente ser distribuidas en volúmenes de 450µl (alrededor de 0.15 mg de proteína) en tubos Eppendorf que funcionaron como cámaras de incubación.

En todos los casos las soluciones fueron previamente oxigenadas y mantenidas a 4°C.

Fármacos.

Para este estudio el (-)baclofen (CGP 11973 A) fue gentilmente donado por Novartis (Basel, Suiza), el ácido 3-aminopropil(metil)fosfinico-HCl (3-APMP) fue obtenido de RBI (Massachusetts, USA), el (±) baclofen, el, ácido 3-mercaptopropiónico

(inhibidor de la enzima GAD); el fosfato de piridoxal; la β -alanina (inhibidor de la recaptura glial de GABA) y el ácido aminooxiacético (un inhibidor de la recaptura neuronal de GABA) fueron obtenidos de Sigma. La [3,4- $^3\text{H}(\text{N})$]glutamina (30-60 Ci/mmol) y el [2,3- $^3\text{H}(\text{N})$]GABA (70-100 Ci/mmol) fueron obtenidos de New England Nuclear (Boston MA, USA).

Liberación de [^3H]GABA.

La regulación de la liberación de GABA se determinó midiendo el efecto del (-)baclofen sobre la liberación de [^3H]GABA de prismas de corteza cerebral. Para esto, los prismas se estabilizaron durante 30 min, en un medio Krebs-Tris a 37 °C. Posteriormente los prismas se incubaron durante 10 min. en 1 ml del mismo medio Krebs-Tris adicionado con 20 μCi de [^3H]GABA (40 Ci/mmol, 20 μM de GABA), 100 μM de β -alanina como inhibidor de la recaptura glial del GABA y 10 μM de ácido. aminooxiacético para prevenir el metabolismo del [^3H]GABA por la enzima GABA-T. Posteriormente los prismas se lavaron con 3 ml de medio Krebs-Tris conteniendo 10 μM de ác. aminooxiacético y 1 μM de ácido. nipecótico, para evitar la recaptura del [^3H]GABA liberado. Dichas sustancias permanecieron en todos los medios durante la superfusión. Los prismas se colocaron en cámaras de superfusión y se lavaron con el mismo medio durante 40 min. con un flujo de 1.5 ml/min., flujo que se mantuvo durante toda la superfusión . Al finalizar este periodo de lavado, a la mitad de las cámaras de superfusión se les cambió el medio por uno conteniendo 30 μM de (-)baclofen que se mantuvo hasta el fin de la superfusión. Para estimular la liberación de [^3H]GABA, 5 min. después de la adición del (-)baclofen se cambio el medio de superfusión por uno conteniendo 30 mM de K^+ y se mantuvo la superfusión con este medio durante 10 min. Finalizado este periodo, las rebanadas se lavaron por 5 min. adicionales para regresar a la liberación basal. Durante la superfusión se colectaron fracciones cada minuto. A las fracciones colectadas se les adicionó 5 ml de Tritosol y se midió la radioactividad presente en ellas mediante un contador de centello líquido convencional con una eficiencia cercana al 30%. La radioactividad presente en los prismas al final de la superfusión fue medida en la misma forma, aunque previamente el tejido fue solubilizado con 1 ml de SDS al 2%.

Dado que por experimentos realizados en este laboratorio (Pérez de la Mora, et. al., 1993) se demostró que la radioactividad liberada por el tejido correspondía a [³H]GABA en más de un 80 %, la liberación de [³H]GABA se determinó en cada fracción como el porcentaje de la radioactividad presente en ella con respecto a la radioactividad total presente en el tejido al momento de su recolección. La radioactividad total se determinó sumando a la radioactividad presente en el tejido al final de la superfusión la radioactividad en todas las fracciones que se colectaron. La liberación basal de [³H]GABA fue determinada del promedio de la radioactividad liberada en las 5 fracciones previas a la adición de K⁺ en el medio de superfusión y fue restada a la radioactividad presente en las fracciones obtenidas durante la estimulación con K⁺.

Síntesis de GABA.

Rebanadas y prismas.

La síntesis de [³H]GABA se determinó cuantificando la incorporación de la radioactividad procedente de [³H]glutamina a [³H]GABA. Para ello, tanto las rebanadas como los prismas obtenidos se mantuvieron durante 40 min. en 400 µl de medio Krebs-Tris, pH 7.2 a 37°C, oxigenado, para restablecer el equilibrio metabólico del tejido. Terminando dicho periodo de estabilización el tejido fue preincubado por 5 min. con o sin el fármaco a probar y posteriormente fue incubado con 5 µCi de [³H]glutamina (0.16-0.32 µM de glutamina) en un volumen final de 500 µl. La incorporación de radioactividad a [³H]GABA se detuvo por enfriamiento rápido (a 0°C) seguido por la aspiración del medio de incubación. El tejido fue lavado con 3 ml de medio frío que fueron inmediatamente aspirados.

Sinaptosomas.

La síntesis de GABA en los sinaptosomas se evaluó por un procedimiento muy similar al descrito para las rebanadas y prismas. Los sinaptosomas se resuspendieron en 450 μ l de medio Krebs-Tris. Al finalizar el periodo de estabilización, los sinaptosomas se centrifugaron a 12,500 x g durante 1 min. y el pellet sinaptosomal se resuspendió en 500 μ l de medio Krebs-Tris con 5 o 15 mM de K^+ a 37°C, conteniendo el fármaco a estudiar y 5 μ Ci de [3 H]glutamina. La síntesis se detuvo por centrifugación a 13,000 x g y aspiración del sobrenadante radioactivo. El pellet sinaptosomal se lavó superficialmente con 1 ml de medio fresco a 0°C.

Extracción de los aminoácidos.

Los aminoácidos fueron extraídos con etanol al 80% y posteriormente deslipidizados. Para ello, el tejido lavado fue sonificado por 20 seg. en 1.5 ml de etanol al 80 % conteniendo 37.5 nmoles de L-norleucina como estandar interno. Las muestras se centrifugaron 10 min. a 3000 rpm y los sobrenadantes se mezclaron con 5 ml de cloroformo. Tras una nueva centrifugación (5 min. a 3000 rpm) se separaron dos fases. De la fase acuosa, la cual contenía los aminoácidos, se tomaron 100 μ l. Las muestras se secaron por liofilización y los aminoácidos se resuspendieron en 10 μ l de un buffer de bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.0. Los pellets conteniendo el tejido sonificado se resuspendieron en 1 ml de NaHO 0.1 M y se mantuvieron congelados a -20°C hasta el momento de hacer la medición de proteína.

Derivatización de los aminoácidos.

Los aminoácidos suspendidos en 10 μ l del buffer de bicarbonato de sodio se derivatizaron con cloruro de DABSILO según la técnica descrita por Chang et al (1981). A las muestras de aminoácidos se les agregaron 20 μ l de una solución de cloruro de DABSILO (1.3 mg/ml) en acetonitrilo y se incubaron a 70°C durante 12 min. teniendo

cuidado de agitarlos vigorosamente a los minutos 1 y 4 de la derivatización. Al término de la derivatización los aminoácidos derivatizados se diluyeron con 220 µl de un buffer de fosfato de sodio dibásico pH 6.5 y conservados en refrigeración hasta su cuantificación posterior por medio de HPLC.

Separación y cuantificación del GABA.

Los aminoácidos extraídos del tejido cerebral tras su derivatización se separaron y cuantificaron por medio del sistema HPLC “Gold” de Beckman Instruments. Dicho sistema incluye un juego de bombas que permiten la generación de gradientes, y un detector de luz ultravioleta/visible que detecta y cuantifica los aminoácidos derivatizados tras su separación cromatográfica. La columna que se utilizó para las separaciones fue de sílica gel, C18, (Ultrasphere) para separaciones en fase reversa.

Para la cromatografía se utilizó como fase móvil un gradiente formado de la mezcla de dos fases de corrimiento (Tabla 1). La fase A contenía citrato de sodio 10 mM, pH 6.5 y 4% de dimetilformamida (DMF), en tanto que la fase B estaba constituida de 30% de la fase A y 70% de acetonitrilo conteniendo 4% de DMF.

La radioactividad incorporada a [³H]GABA y la radioactividad residual en [³H]glutamina se midió colectando las fracciones cromatográficas correspondientes y midiendo la radioactividad presente en ellas por medio de un contador de centelleo líquido convencional.

La incorporación de radioactividad a [³H]GABA a partir de [³H]glutamina se expresó como el porcentaje de la radioactividad presente en [³H]GABA con respecto a la radioactividad presente en [³H]glutamina (porcentaje de la rad. en [³H]GABA), y como la radioactividad específica en los dos aminoácidos expresada como dpm/pmol.

Cuantificación de proteínas .

La proteína fue medida por el método de Lowry et.al.(1951). Para ello los pellets obtenidos tras la extracción de los aminoácidos con etanol se solubilizaron en 1 ml de NaOH 0.1 N, donde se mantuvieron por lo menos 24 horas para facilitar su disgregación.

Estadística.

En todos los casos los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM). Para los experimentos de liberación de [³H]GABA se obtuvieron las áreas bajo la curva para los picos de liberación de [³H]GABA y las diferencias entre las liberaciones obtenidas en presencia o en ausencia de las drogas utilizadas se evaluaron mediante la prueba “t” de Student. En los experimentos de síntesis de [³H]GABA para buscar diferencias entre los grupos se utilizó una ANOVA de una sola vía, y la prueba de Dunnet como prueba *post hoc*.

Resultados

Separación y cuantificación de GABA.

Después de probar diversos métodos de separación se adoptó el gradiente que se muestra en la Tabla 1. Dicho gradiente nos permite la separación de GABA, y glutamina, del resto de los aminoácidos presentes en los extractos obtenidos de cerebro de rata. La separación de estos aminoácidos permitió medir tanto sus niveles como la radioactividad presente en ellos, con lo cual se pudo medir la incorporación de radioactividad en GABA a partir de [³H]glutamina. En la Fig. 2 se muestra un cromatograma obtenido a partir de un extracto de hipotálamo de rata. Como se puede observar, tanto el GABA como la glutamina se encuentran claramente separados del resto de los aminoácidos presentes en el extracto. La radioactividad dentro del cromatograma se encontró exclusivamente al inicio de éste y en los sitios correspondientes a los aminoácidos glutamato, glutamina y GABA. El límite mínimo de detección para los aminoácidos fue de 3 pmoles en 20 μ l del extracto derivatizado.

Tabla 1.

Tiempo (min)	Fase A %	Fase B %	Duración del cambio
Inicio	71.0	29.0	-
2.00	62.0	38.0	8.00
10.00	57.0	43.0	4.00
16.00	31.6	68.4	4.50
20.50	0.0	100.0	6.00
31.50	71.0	29.0	0.50

Gradiente formado para la separación del GABA y la Gln por medio de HPLC, la tasa de flujo fue de 1.5 ml/min.

Síntesis de [³H]GABA.

La incorporación de radioactividad a GABA proveniente de [³H]glutamina se midió en diferentes regiones del cerebro. Como se aprecia en la Fig 3, la incorporación de radioactividad en [³H]GABA es claramente más grande en el hipotálamo que en la corteza cerebral y el núcleo caudado, en donde la incorporación de radioactividad a GABA es similar. Debido a que en el hipotálamo se registró la mayor incorporación de radioactividad al GABA y que los autorreceptores GABA_B han sido ampliamente descritos en la corteza cerebral, estas dos regiones fueron seleccionadas en nuestros experimentos para estudiar la síntesis del [³H]GABA.

Efecto del tiempo de incubación sobre la incorporación de radioactividad en GABA a partir de [³H]glutamina.

En la Fig. 4 se muestran los niveles de glutamina y GABA en rebanadas de hipotálamo de rata, incubadas hasta 60 min. en presencia de [³H]glutamina. Como se puede apreciar en la figura, los niveles de ambos aminoácidos permanecieron constantes durante el tiempo de incubación. La incorporación de la radioactividad en GABA a partir de [³H]glutamina se incrementó en forma lineal hasta los 20 min. de incubación (Fig. 5). En

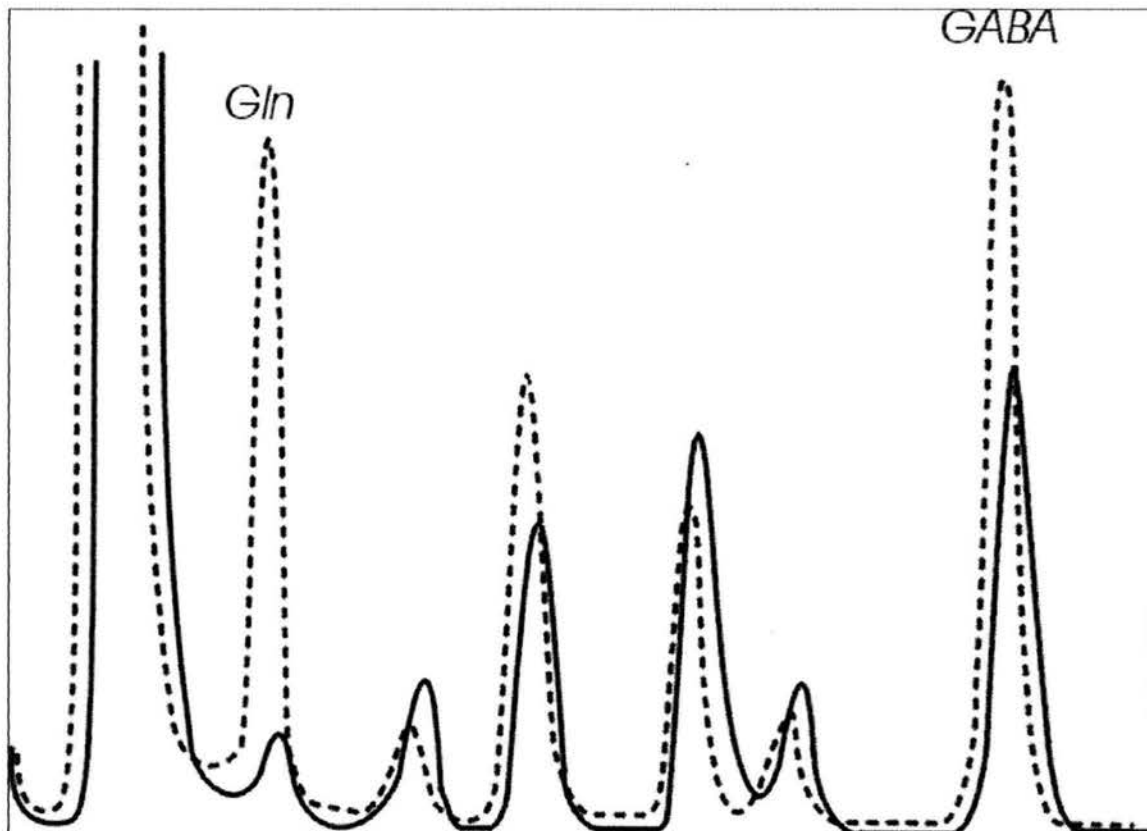


Fig. 2 Cromatogramas obtenidos a partir de un extracto de hipotálamo de rata. Como se puede observar en la superposición, tanto el GABA como la glutamina se encuentran claramente separados del resto de los aminoácidos presentes en el extracto. La línea punteada muestra el cromatograma de un extracto de hipotálamo al cual se le adicionaron GABA y glutamina (Gln) en cantidades equimolares.

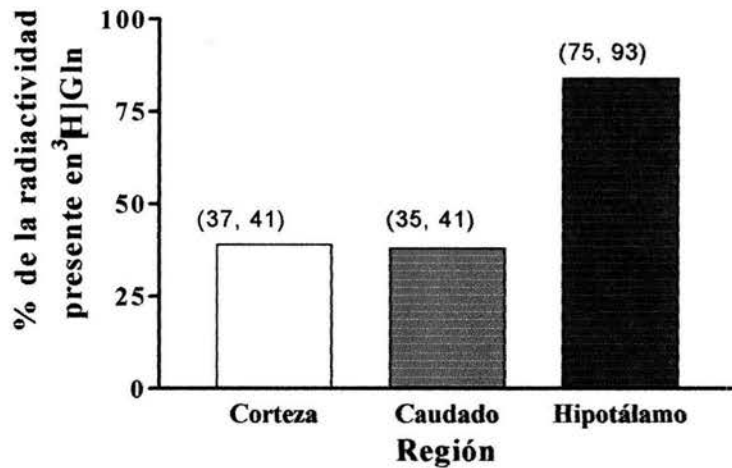


Fig. 3.- Incorporación de radioactividad en GABA procedente de [^3H]glutamina. Rebanadas de corteza cerebral, núcleo caudado e hipotálamo de rata se incubaron 20 min. en presencia de [^3H]glutamina (5 μCi). Las barras muestran la media de un ensayo realizado por duplicado, expresado como porcentaje de la radioactividad presente en la [^3H]glutamina. Entre paréntesis se muestran los valores individuales usados para obtener el promedio. Para mayores detalles véase la sección de Métodos.

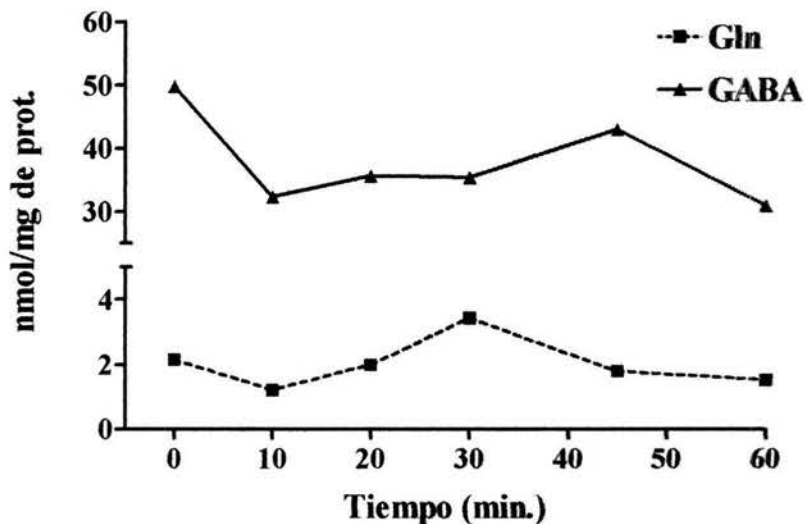


Fig. 4.- Efecto del tiempo de incubación sobre los niveles de glutamina y GABA en rebanadas de hipotálamo de rata incubadas en presencia de [^3H]glutamina. Los puntos son la media de un ensayo realizado por duplicado. Los niveles tisulares tanto de GABA como de glutamina permanecen prácticamente constantes hasta por una hora a partir del inicio de la incubación con [^3H]glutamina. Para detalles metodológicos véase la sección de Métodos.

virtud de estos resultados, el tiempo de incorporación elegido para la mayor parte de los experimentos fue de 10 min.

Como se puede observar en la Fig. 6, los niveles de [^3H]glutamina en el medio de incubación, a juzgar por la radioactividad presente en los picos correspondientes a estos aminoácidos, no limitan ni su incorporación al tejido ni la síntesis de [^3H]GABA, ya que estos permanecieron inalterables durante la incubación de las rebanadas con [^3H]glutamina.

Efecto del ácido 3-mercaptopropiónico y del fosfato de piridoxal sobre la incorporación de radioactividad en GABA a partir de [^3H]glutamina en rebanadas de hipotálamo.

Con el objeto de observar la sensibilidad de nuestro método para detectar condiciones capaces de modificar la síntesis de [^3H]GABA se probó el efecto del PLP y del ácido 3-MP, un potente inhibidor de la GAD, sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de [^3H]glutamina en rebanadas de hipotálamo de rata. Como se observa en la Fig 7A, y de acuerdo a lo esperado, el porcentaje de radioactividad presente en [^3H]GABA se redujo en un 70 % por la acción del 3-MP con respecto a sus controles. La radioactividad específica del [^3H]GABA fue también reducida (Fig. 7B). El PLP en cambio, no modificó sustancialmente la incorporación de radioactividad a GABA (Fig. 7A) ni su actividad específica (Fig. 7B). En la misma figura se puede apreciar que la [^3H]glutamina no cambió su actividad específica con ninguno de los dos tratamientos.

Efecto de la estimulación de los autorreceptores GABA_B sobre la liberación de [^3H]GABA de prismas y rebanadas de corteza cerebral.

Con el fin de confirmar que los autorreceptores GABA_B podían ser activados en nuestro sistema se probó el efecto del (-)baclofen sobre la liberación de [^3H]GABA estimulada por concentraciones altas de K⁺ de prismas y sinaptosomas de corteza cerebral. En la Fig. 8A se puede observar que el (-)baclofen (10 μM) provocó una disminución del 26 % en la liberación de [^3H]GABA estimulada por 15 mM de KCl en el medio de superfusión de prismas corticales. Una disminución similar (20 %) fue observada cuando el efecto del

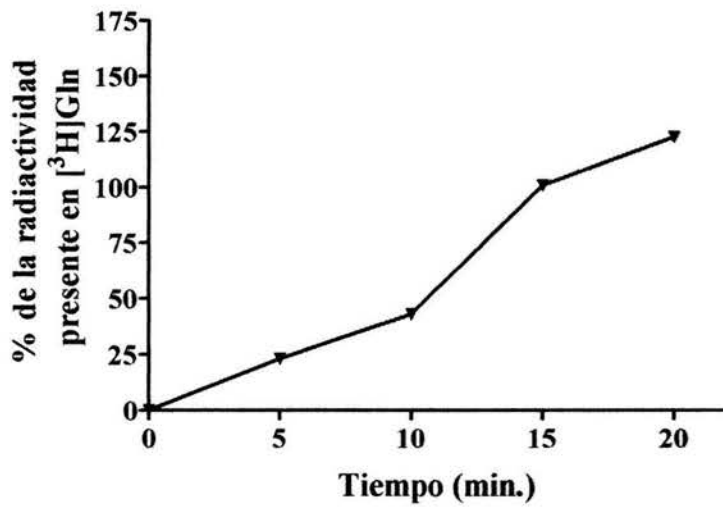


Fig. 5.- Efecto del tiempo de incubación sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de $[^3\text{H}]\text{glutamina}$. Rebanadas de hipotálamo de rata se incubaron de 0 a 20 min. en presencia de $[^3\text{H}]\text{glutamina}$ como se describe en Métodos. Los puntos muestran la media de un experimento realizado por triplicado. Obsérvese que la incorporación de radioactividad en GABA es lineal hasta los 20 min. de incubación con $[^3\text{H}]\text{glutamina}$.

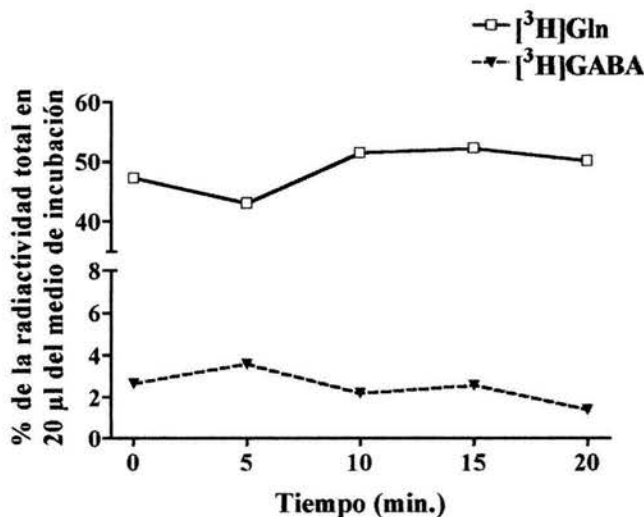


Fig. 6.- Efecto del tiempo de incubación sobre los niveles de GABA en el medio de incubación. Rebanadas de hipotálamo de rata se incubaron con $[^3\text{H}]\text{glutamina}$ y a los tiempos que se indica y se determinó la radioactividad presente en $[^3\text{H}]\text{glutamina}$ y $[^3\text{H}]\text{GABA}$ en alícuotas de 20 μl del medio de incubación. La radioactividad asociada a estos aminoácidos se expresa como el porcentaje de la radioactividad presente en 20 μl del medio derivatizado. Los puntos indican la media de un experimento realizado por triplicado. Obsérvese que la radioactividad presente en estos aminoácidos no cambia apreciablemente en el medio durante la incubación de las rebanadas con $[^3\text{H}]\text{glutamina}$, además de que el sustrato no es una limitante para la síntesis de $[^3\text{H}]\text{GABA}$.

(-)-baclofen 30 μM se probó en sinaptosomas de corteza cerebral (Fig. 8B). Sin embargo, el antagonista de los receptores GABA_B, el CGP 52432, no mostró ningún efecto sobre la liberación de [³H]GABA estimulada por alto K⁺ de prismas de la misma región.

Efecto de la concentración del GABA en el medio de incubación sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de [³H]glutamina en rebanadas de hipotálamo.

Se estudió el efecto de la concentración de GABA en el medio de incubación sobre la incorporación de la radioactividad en GABA proveniente de [³H]glutamina fue estudiado. Para esto, rebanadas de hipotálamo de rata se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de GABA no radiactivo y como se puede apreciar en la Fig. 9, la presencia de GABA (0 a 10 μM) en el medio de incubación no modificó la incorporación a GABA de la radioactividad proveniente de [³H]glutamina.

Efecto de agonistas gabaérgicos sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de [³H]glutamina.

Debido a que el GABA aplicado extracelularmente a las rebanadas podría haber activado diversos tipos de receptores gabaérgicos con acciones antagónicas sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de [³H]glutamina el efecto de agonistas específicos para los receptores GABA_A y GABA_B sobre la incorporación de radioactividad en [³H]GABA proveniente de [³H]glutamina fue estudiada en rebanadas de hipotálamo. Como puede observarse en la Fig. 10, el muscimol, un agonista gabaérgico tipo A, no presentó efecto alguno sobre la incorporación de radioactividad al GABA proveniente de [³H]glutamina. Tampoco tuvieron efecto sobre la incorporación de radioactividad al GABA proveniente de [³H]glutamina el (\pm)baclofen, un agonista gabaérgico tipo B, ni sus isómeros individuales, el (-)baclofen y el (+)baclofen, correspondientes a sus formas activa e inactiva, respectivamente (Fig. 11). La actividad específica del [³H]GABA no se modificó con ninguno de los tratamientos anteriores (Fig 10 y 11).

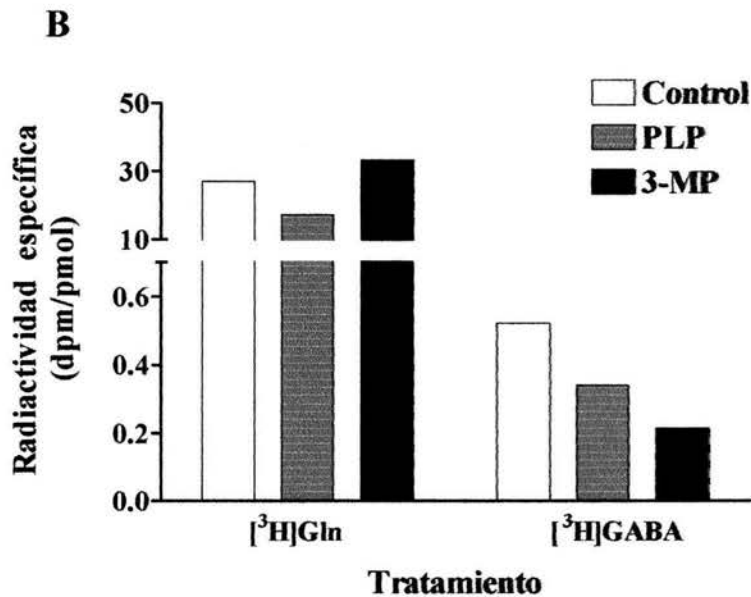
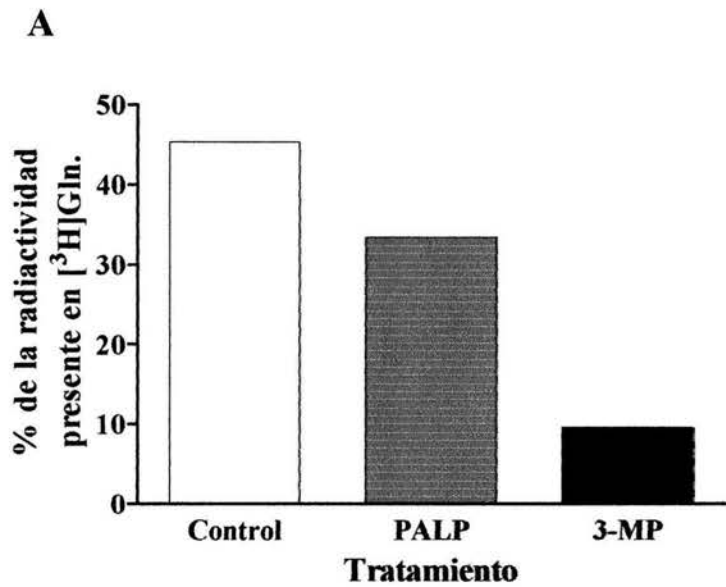


Fig. 7.- Efecto del fosfato de piridoxal (PLP) y del ácido 3-mercaptopropionico (3-MP) sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de $[^3\text{H}]\text{glutamina}$ en rebanadas de hipotálamo. En el panel A de la figura se muestra el porcentaje de la radioactividad presente en $[^3\text{H}]\text{GABA}$ con respecto a la radioactividad presente en $[^3\text{H}]\text{glutamina}$ y en el panel B se muestra la radioactividad específica de los aminoácidos. Las barras muestran la media de un experimento realizado por triplicado.

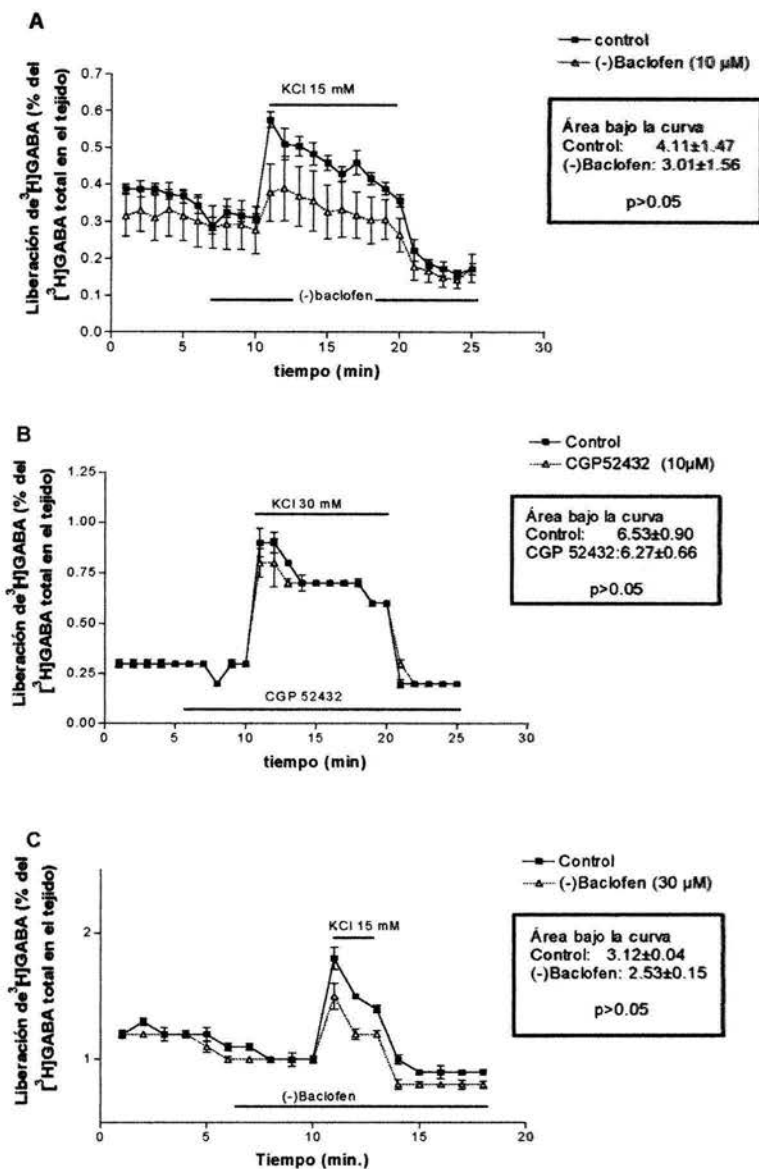


Fig 8. Efectos del (-)baclofen y del CGP 52432 sobre la liberación de ^3H GABA de prismas y sinaptosomas de corteza cerebral de rata. La liberación de GABA fue evocada al cambiar el medio Krebs-tris por uno con la concentración de KCl indicada. El medio conteniendo el (-)baclofen o el CGP 52432 fueron usados para superfundir las cámaras experimentales durante el periodo indicado. La liberación del ^3H GABA se expresa como el porcentaje de la radioactividad presente en la preparación al momento de la estimulación. Los valores son la media \pm EEM de 3-4 experimentos independientes realizados por triplicado. El área bajo la curva de los picos de la liberación de ^3H GABA estimulada por alto K^+ fueron obtenidos para cada superfusión y la diferencia entre los valores control y experimental fueron evaluados por medio de la prueba "t" de Student. Las barras de error estándar fueron omitidas en aquellos puntos donde su tamaño fue más pequeño que el símbolo correspondiente. A y B: Liberación de ^3H GABA de prismas corticales. C: liberación de ^3H GABA de sinaptosomas corticales. Para ver una completa descripción del procedimiento experimental ver la sección de Métodos

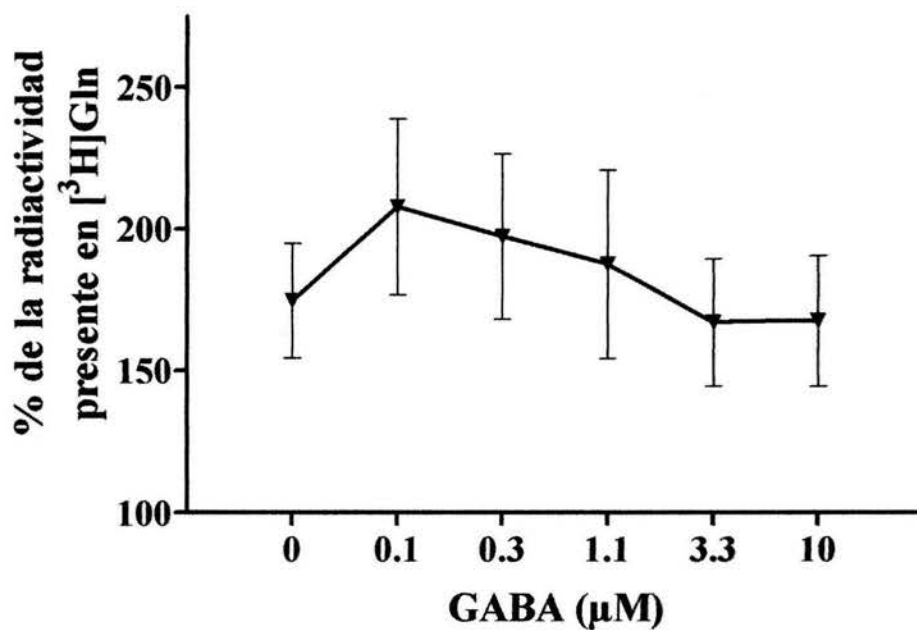


Fig. 9.- Efecto de la concentración de GABA en el medio de incubación sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de $[^3\text{H}]\text{glutamina}$. Rebanadas de hipotálamo se incubaron con varias concentraciones de GABA y la incorporación de radioactividad proveniente de $[^3\text{H}]\text{glutamina}$ en este aminoácido se evaluó como se describe en Métodos. Los puntos representan la media \pm EEM de 7 experimentos independientes realizados por triplicado.

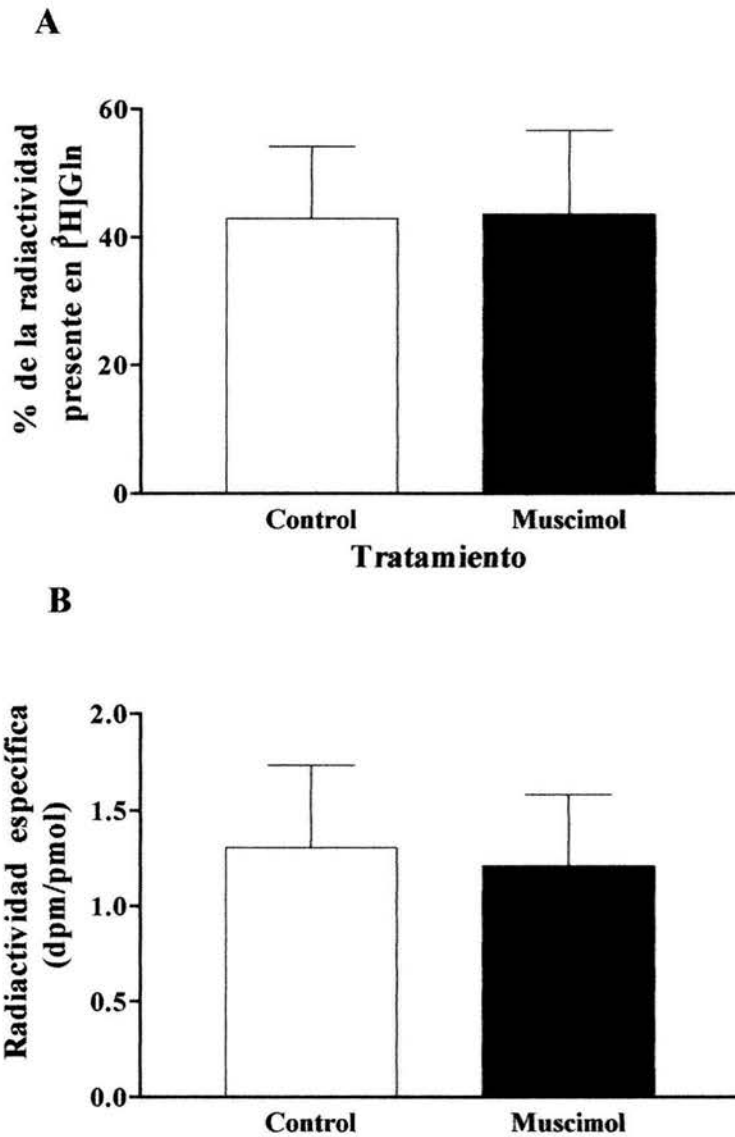


Fig 10.- Efecto del muscimol (300 nM) sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de $[^3\text{H}]\text{glutamina}$ en rebanadas de hipotálamo de rata. En el panel A se muestra el porcentaje de la radioactividad presente en $[^3\text{H}]\text{GABA}$ con respecto a la radioactividad presente en $[^3\text{H}]\text{glutamina}$. La actividad específica para $[^3\text{H}]\text{GABA}$ y $[^3\text{H}]\text{glutamina}$ se muestra en el panel B. Obsérvese la falta de efectos estadísticamente significativos de las sustancias probadas sobre cada uno de estos parámetros. Las barras indican la media \pm EEM de 4 experimentos realizados por triplicado.

Con el objeto de estudiar con más detalle los efectos del baclofen sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de [^3H]glutamina, se estudiaron los efectos de diferentes concentraciones de (-)baclofen, sobre los autorreceptores gabaérgicos tipo B en prismas de hipotálamo y corteza cerebral de rata. Como puede verse en la Figura 12, concentraciones tan altas de (-)baclofen como 100 μM fueron incapaces de afectar significativamente la incorporación de radioactividad al GABA y su radioactividad específica en prismas de hipotálamo. Resultados análogos fueron obtenidos en prismas de corteza cerebral (Fig. 13).

Efecto del ácido 3-amino-propil (metil) fosfónico (3-APMP) sobre la incorporación de radioactividad al GABA proveniente de [^3H]glutamina en prismas de hipotálamo

Para eliminar la posibilidad de que la falta de efectos del (-)baclofen se debiera a una baja potencia de este compuesto para estimular los receptores GABA_B involucrados en la síntesis del GABA, se evaluó, en prismas de corteza cerebral (Fig. 14), el efecto de 3-APMP, que es 10 veces más potente que el (-)baclofen, sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de [^3H]glutamina. Sin embargo, al igual que sucedió con el (-)baclofen la incorporación de la radioactividad en el GABA proveniente de [^3H]glutamina no se afectó significativamente en presencia de 3-APMP. Resultados análogos se encontraron con una concentración de 10 μM en prismas de hipotálamo (resultados no mostrados).

Efecto del (-)baclofen sobre la incorporación de radioactividad al GABA proveniente de [^3H]glutamina bajo condiciones despolarizantes.

En vista de que la activación de los receptores GABA_B por el (-) baclofen resultaría en la modulación de la síntesis del GABA al momento de su liberación; se probó el efecto de este agonista junto con concentraciones despolarizantes de K^+ en sinaptosomas de corteza cerebral. Como puede observarse en la Fig 15, el (-)baclofen a una concentración de 30 μM , no modificó tampoco, bajo estas condiciones, la incorporación de la radioactividad en el GABA proveniente de [^3H]glutamina .

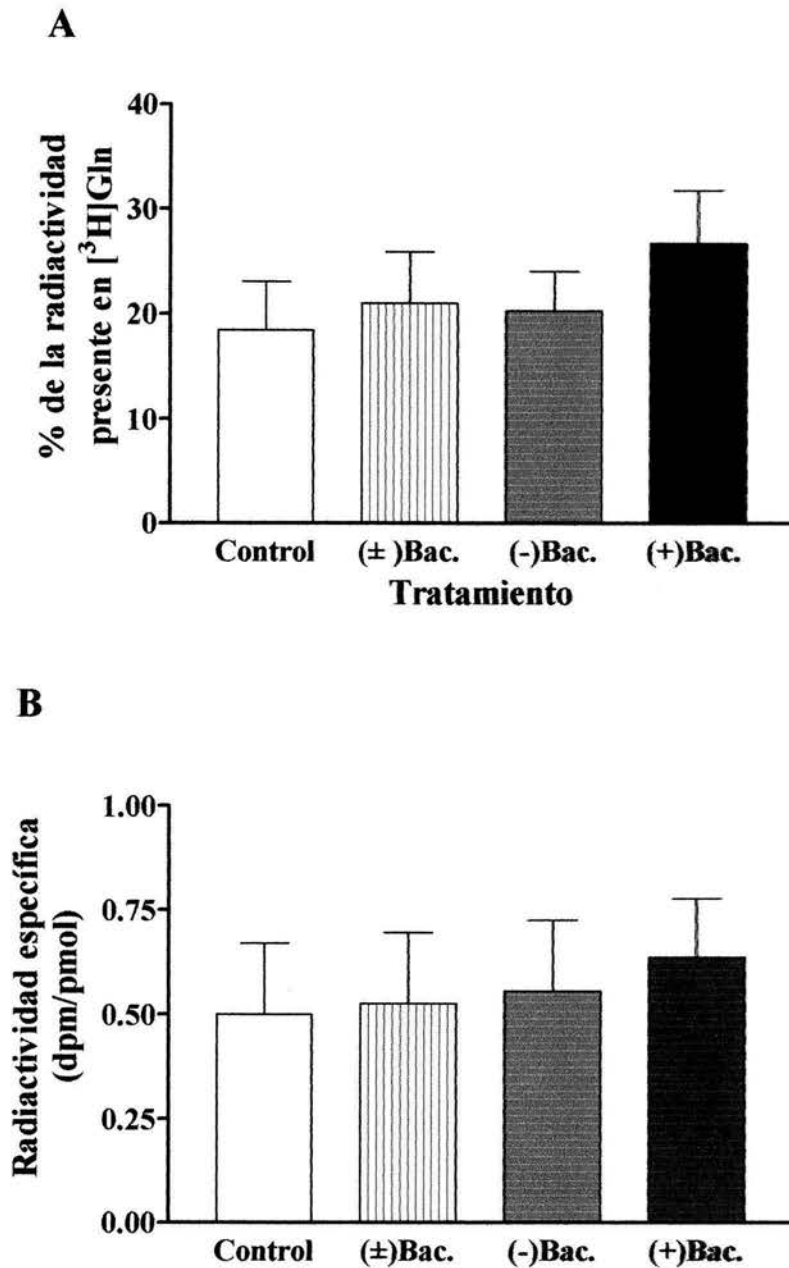


Fig. 11.- Efecto de diferentes isómeros de baclofen (bac.) sobre la incorporación de la radioactividad en GABA proveniente de $[^3\text{H}]\text{glutamina}$ en prismas de hipotálamo de rata. Las concentraciones usadas fueron de $20\ \mu\text{M}$ para la forma racémica de baclofen y $10\ \mu\text{M}$ para los otros dos isómeros del baclofen. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos independientes realizados por triplicado.

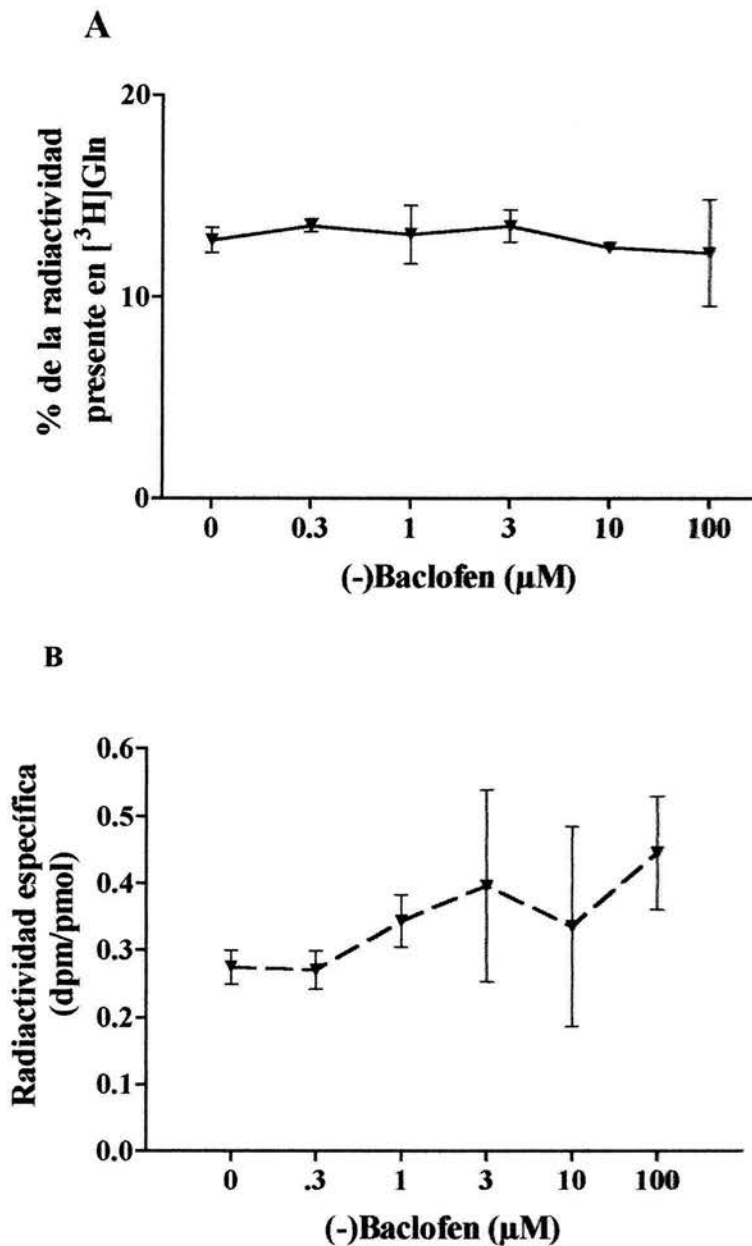


Fig. 12.- Efecto de diferentes concentraciones de (-)baclofen, sobre la incorporación de radioactividad a GABA a partir de $[^3\text{H}]$ glutamina en prismas de hipotálamo de rata. En A se muestra el porcentaje de radioactividad presente en $[^3\text{H}]$ GABA con respecto a la radioactividad presente en $[^3\text{H}]$ glutamina y en B actividad específica del $[^3\text{H}]$ GABA. Los puntos muestran la media \pm EEM de tres experimentos realizados cada uno por triplicado. Obsérvese la falta de efectos del (-)baclofen sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de $[^3\text{H}]$ glutamina.

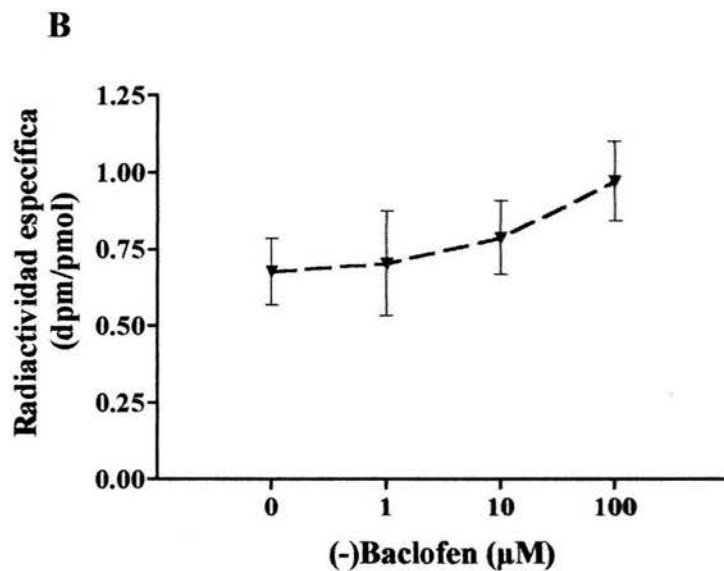
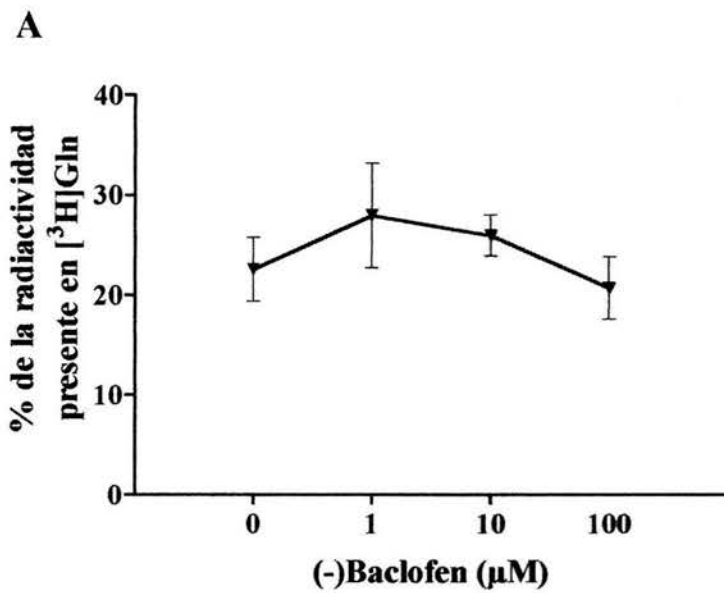


Fig. 13.- Efecto del (-)baclofen sobre la incorporación de radioactividad a [³H]GABA proveniente de [³H]glutamina en prismas de corteza cerebral de rata. Los puntos representan la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. Obsérvese la falta de efectos del (-)baclofen sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de [³H]glutamina

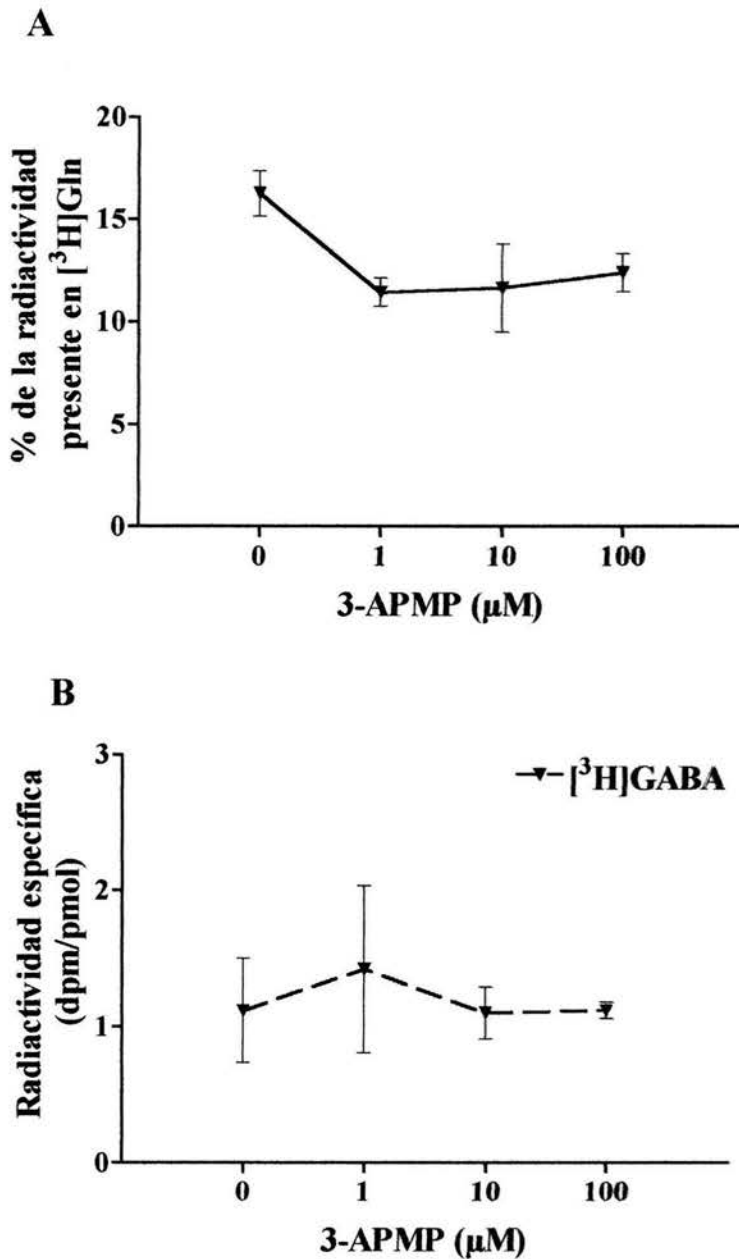


Fig. 14.- Efecto de las varias concentraciones de 3-APMP sobre la incorporación de radioactividad a GABA proveniente de $[^3\text{H}]\text{glutamina}$ en prismas de corteza cerebral de rata. Los puntos representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados cada uno por quintuplicado.

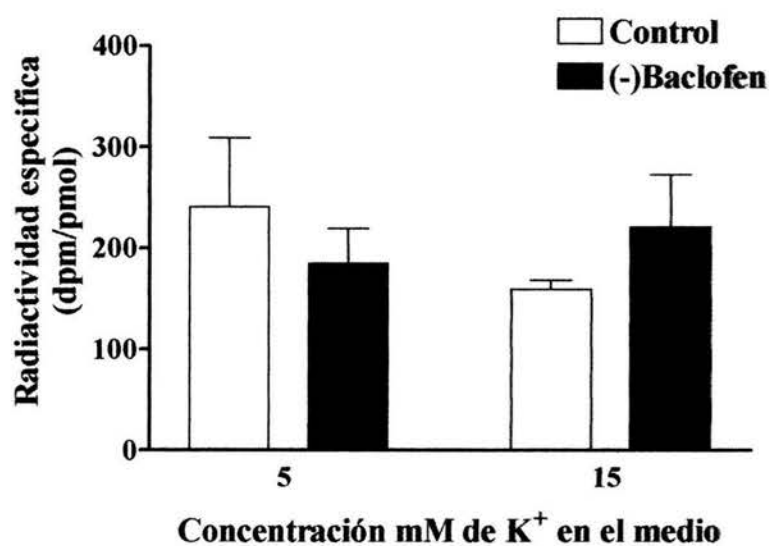


Fig. 15.- Efecto del (-)baclofen sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de [³H]glutamina en condiciones despolarizantes. Sinaptosomas de corteza cerebral de rata fueron incubados en un medio conteniendo 30 μM de (-)baclofen, con 5 o 15 mM de KCl y la incorporación de radioactividad a GABA proveniente de [³H]glutamina fue estudiada. Las barras representan la media ± EEM de 3 experimentos independientes.

Efecto del antagonista gabaérgico tipo B, CGP52432 sobre la incorporación de radioactividad al GABA proveniente de [³H] glutamina.

Para evaluar la posibilidad de que la falta de efectos de los agonistas gabaérgicos tipo B usados, se debieran a la ocupación previa de los receptores gabaérgicos tipo B por el GABA presente en la preparación usada, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones del antagonista gabaérgico tipo B sobre la incorporación de la radioactividad al GABA proveniente de [³H]glutamina. En la Fig. 16 se muestra que, como sucedió con los agonistas, el CGP52432 fue incapaz de modificar la incorporación de radioactividad al GABA proveniente de [³H]glutamina.

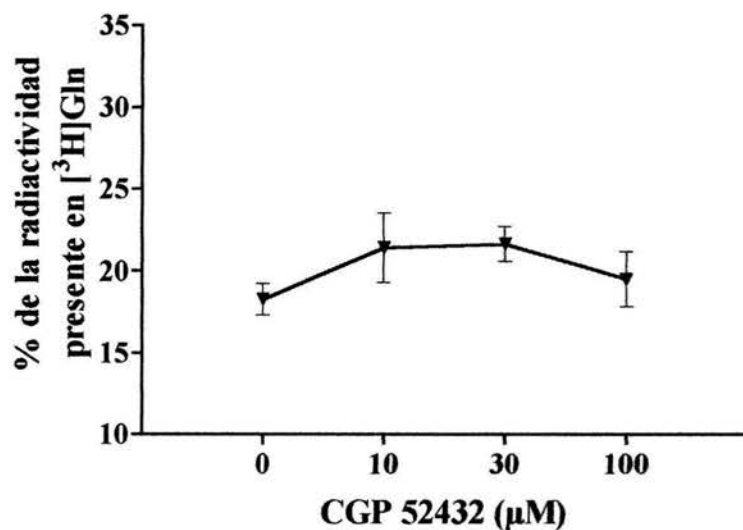
Efecto del (±)baclofen sobre la incorporación de radioactividad a GABA proveniente de [³H] glutamato.

Para descartar la posibilidad de que bajo las condiciones experimentales usadas, la compartimentalización del glutamato estuviera afectada y la glutamina no se comportara ya como el mejor precursor para la síntesis del GABA, prismas de hipotálamo fueron incubadas con 20 μM de (±) baclofen en presencia de [³H]glutamato. Los resultados que se muestran en la Fig. 17, a pesar de que indican una incorporación de radioactividad sustancial para el GABA en presencia de [³H]glutamato, (Fig. 17B) no apoyan sin embargo, la posibilidad de que la activación de los receptores gabaérgicos tipo B pudiera modificar la síntesis del GABA a partir del [³H]glutamato, pues no se observaron diferencias significativas en la radioactividad incorporada al GABA a partir de [³H]glutamato.

Efecto de agonistas y antagonistas gabaérgicos tipo B sobre la actividad específica de la [³H]glutamina

Ninguno de los agonistas y antagonistas gabaérgicos tipo B probados en este trabajo afectaron la radioactividad específica de la [³H]glutamina incorporada en las preparaciones usadas (resultados no mostrados).

A



B

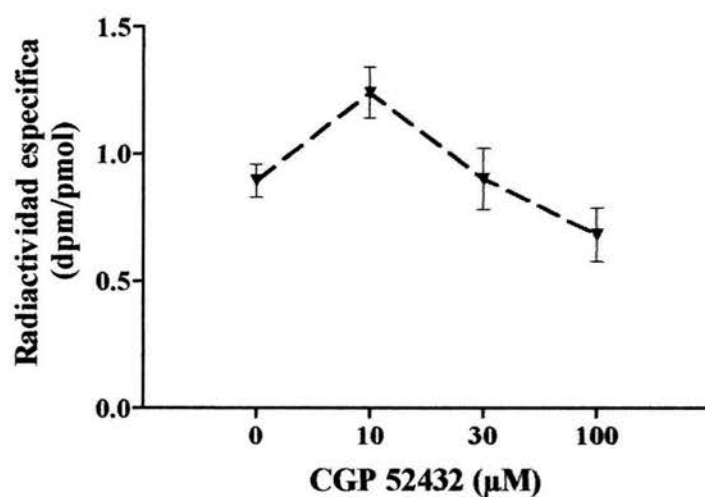


Fig. 16.- Efecto de las varias concentraciones de CGP 52432 sobre la incorporación de radioactividad a $[^3\text{H}]\text{GABA}$ proveniente de $[^3\text{H}]\text{glutamina}$ en prismas de corteza cerebral de rata. Los puntos representan la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado. Obsérvese la falta de efectos sobre la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de $[^3\text{H}]\text{glutamina}$.

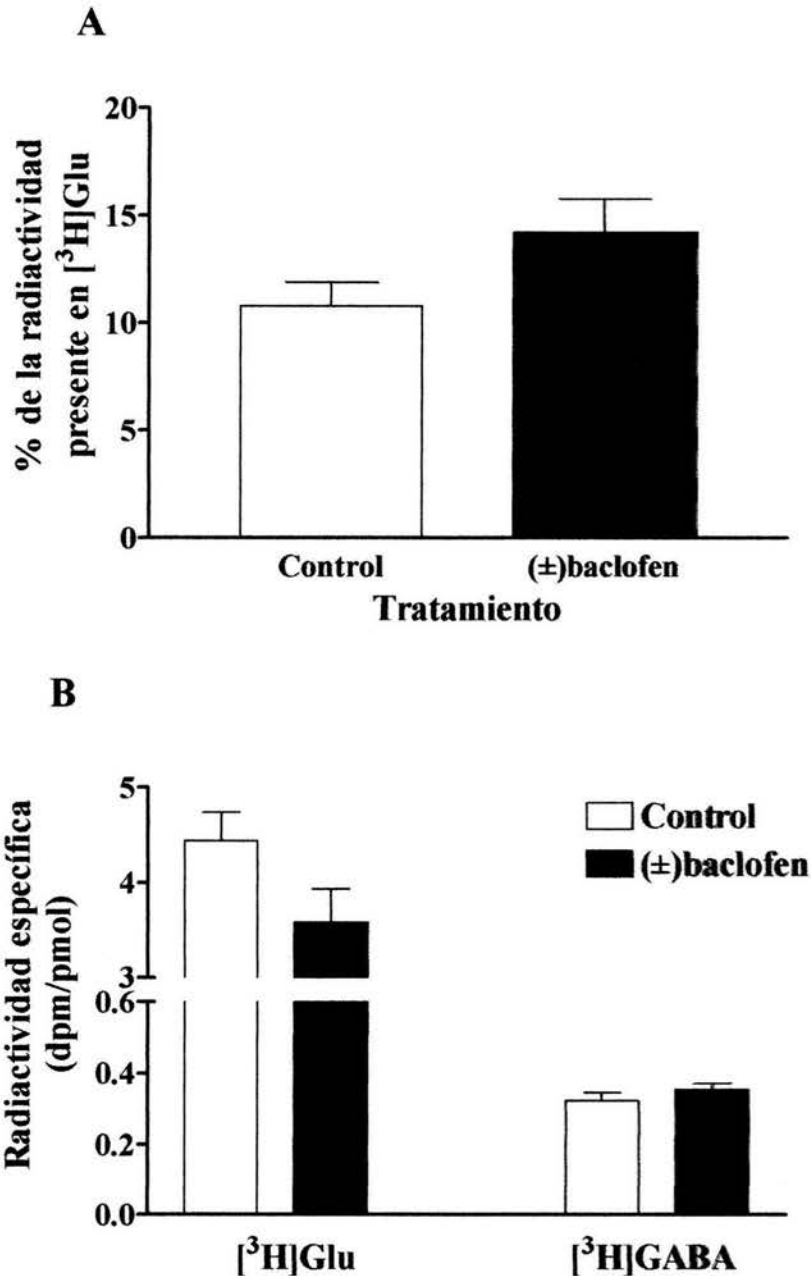


Fig. 17.- Efecto de 20 μM de (\pm)baclofen sobre la incorporación de la radioactividad en GABA proveniente de $[^3\text{H}]\text{glutamato}$ en prismas de hipotálamo de rata. En A se muestra el % de radioactividad presente en $[^3\text{H}]\text{GABA}$ con respecto a la radioactividad presente en $[^3\text{H}]\text{glutamato}$. La actividad específica de $[^3\text{H}]\text{glutamato}$ y $[^3\text{H}]\text{GABA}$ se muestra en la figura B. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos realizados por quintuplicado. El (\pm)baclofen fue incapaz de modificar la incorporación de radioactividad en GABA proveniente de $[^3\text{H}]\text{glutamato}$.

Discusión

Desde el punto de vista analítico, la medición del GABA se realizó mediante técnicas de HPLC que permiten una excelente separación del GABA y de la glutamina del resto de los aminoácidos presentes en los extractos de cerebro (Fig. 2) y por consiguiente una adecuada cuantificación de su cantidad y de la estimación de la radioactividad presente en cada uno de ellos. El mínimo de detección en nuestro sistema fue de 3 pmoles en 20 μ l de derivatizado. Esta sensibilidad fue adecuada para los fines de este trabajo, pues los niveles obtenidos de cada aminoácido fueron de alrededor de 500 pmoles para el GABA y 50 pmoles para glutamina en el mismo volumen de extracto. La radioactividad incorporada a estos aminoácidos se midió en las fracciones correspondientes a cada uno de ellos mediante un contador de centelleo. Los experimentos control señalaron que en el cromatograma, la radioactividad se asoció al frente de este y a las fracciones correspondientes a glutamato, glutamina y GABA. En todos los ensayos realizados, la fracción correspondiente a la glutamina fue en donde se encontró la mayor cantidad de radioactividad.

El principal hallazgo de este trabajo fue que a diferencia de lo que sucede con otros sistemas de neurotransmisión como los aminérgicos, en el caso del sistema gabaérgico los receptores que regulan la liberación del neurotransmisor no regulan su síntesis. El hallazgo es importante, pues permite suponer la existencia para el caso de los aminoácidos neurotransmisores de otros tipos de acoplamiento entre su síntesis y su liberación. Esta falta de acoplamiento es poco probable que obedezca al enfoque metodológico utilizado pues la glutamina parece ser el mejor precursor para la síntesis del GABA (Baxter, 1976; Shank y Aprison, 1977; Schousboe, et.al., 1997; Pérez de la Mora, et.al. 1999) y en experimentos diseñados para probar la respuesta de la incorporación de radioactividad de la [3 H]glutamina al GABA ante condiciones que pudieran aumentar o disminuir la síntesis de este neurotransmisor (Fig. 7) se encontró que el ácido 3-mercaptopropiónico, que tanto in vitro como in vivo inhibe la actividad de la GAD (Lamar, 1969; Katoh, et. al., 1994) también inhibe la incorporación de radioactividad al GABA proveniente de [3 H]glutamina y disminuye su radioactividad específica. Esta inhibición fue alrededor del 70% y coincide con reportes previos en relación a sus efectos sobre la actividad de la GAD (Lamar, 1969;

Katoh, et. al., 1994). La falta de efectos estimulantes del PLP sobre la síntesis del GABA, no invalida el enfoque usado, pues es posible que este cofactor no halla sido incorporado a los sitios intracelulares en donde se lleva a cabo la síntesis del GABA dada la enorme polaridad que le confiere su grupo fosfato y que, como en el caso de otras sustancias fosforiladas, glucosa 6-fosfato por ejemplo, impide la movilidad de ellas a través de las membranas de las células. Alternativamente, la cantidad de PLP captada por las terminales gabaérgicas podría no haber sido suficiente para estimular intracelularmente la actividad de la GAD como dicho cofactor lo hace en homogenizados de cerebro (Tapia y Sandoval, 1971). Nuestros resultados, por otro lado, mostraron que la incorporación de la radioactividad en el [³H]GABA proveniente de la [³H]glutamina en rebanadas de hipotálamo de rata incubadas con 5 µCi de este aminoácido, es lineal (Fig. 5) durante los primeros 20 min. de incubación, y que durante este tiempo la [³H]glutamina presente en el medio no se vio alterada indicando que la cantidad empleada de [³H]glutamina, no fue un factor limitante para la síntesis del [³H]GABA. Con el fin de homogenizar los resultados, la síntesis de [³H]GABA a partir de [³H]glutamina se expresó como el porcentaje de la radioactividad que se incorporó al GABA en relación a la radioactividad presente en la [³H]glutamina. Dicha forma de expresar la síntesis de GABA permite minimizar diferencias en la captación de [³H]glutamina al tejido. La radioactividad específica del [³H]GABA sintetizado también fue estudiada y los resultados obtenidos se expresan de la misma forma.

La posibilidad de que los receptores gabaérgicos tipo B acoplaran los procesos de síntesis y liberación en solo algunas regiones del cerebro y que el hipotálamo, en donde no se ha caracterizado suficientemente el control de la liberación del GABA por autorreceptores gabaérgicos tipo B, fuera unas de las regiones en donde no se diera este proceso es poco probable, pues resultados similares fueron encontrados en rebanadas de corteza cerebral (Fig. 8) en donde la inhibición de la liberación del GABA por la activación de autorreceptores gabaérgicos del tipo B es ampliamente conocida (Wojcik, y Neff, 1983; Floran et al., 1988; Bowery, 1989; Bonanno y Raiteri, 1992). Es también poco probable que el acoplamiento entre síntesis y liberación en nuestra rebanadas se hubiera alterado a consecuencia del tiempo esperado para la estabilización metabólica de nuestra preparación, pues no se observó ningún efecto sobre la síntesis de GABA cuando la incubación con

[³H]glutamina se realizó tras la obtención inmediata de la preparación (resultados no mostrados).

Como ya se ha mencionado, en el presente trabajo se exploró la posibilidad de que los autorreceptores al GABA, y en particular los autorreceptores GABA_B fueran capaces de regular la síntesis de GABA en el cerebro de la rata. Tal posibilidad se sugiere, como ya se ha mencionado, por el hecho de que existe un fuerte acoplamiento entre la liberación del neurotransmisor y su síntesis en el sistema aminérgico (Carlsson, 1975; Meller et al. 1990; Westernik et al. 1990; Goldstein 1995; Elsworth and Roth, 1996; Gainetdinov et al. 1996). Particularmente en el dopaminérgico, la activación de uno o de un conjunto de diferentes subtipos de autorreceptores metabotrópicos presinápticos permite disminuir tanto la liberación como la síntesis del neurotransmisor (Goldstein, 1995; Elsworth and Roth, 1996; Gainetdinov et al., 1996; Mercuri et al., 1997; Whetzel et al., 1997; Schaffer and Levant, 1998).

Los receptores GABA_B que funcionan como autorreceptores, están acoplados a proteínas G y son capaces de regular la liberación estimulada de GABA (Fig. 8 de este trabajo y Wojcik, y Neff, 1983; Floran et al., 1988; Waldmeier et al., 1992; Lanza et al., 1993). Sin embargo, cuando en nuestros experimentos los receptores GABA_B fueron activados por el agonista (-)baclofen, fueron incapaces de influenciar la síntesis del [³H]GABA a partir de [³H]glutamina tanto en prismas corticales (Fig. 13) como en prismas (Fig 12) y rebanadas (datos no mostrados) de hipotálamo, aun cuando se usó una concentración tan alta de (-)baclofen como 100 μM. Más aún el 3-APMP, un agonista más potente para el receptor GABA_B que el (-)baclofen (Bon y Garlan; 1996), fue también incapaz de modificar la síntesis de [³H]GABA en prismas de hipotálamo (datos no mostrados) y en prismas de corteza cerebral (Fig. 14) incubados con hasta 100 μM de dicho agonista.

La posibilidad de que los agonistas gabaérgicos tipo B solo modularan la síntesis de GABA bajo condiciones en las cuales se liberara este neurotransmisor se descartó, ya que resultados similares fueron observados en prismas de corteza incubados con una

concentración baja (5 mM) o con una concentración alta (15 mM) de KCl capaz de estimular la liberación del GABA (Fig. 15).

Una explicación alternativa para la falta de efectos del (-)baclofen sobre la síntesis de GABA pudiera ser que en nuestras condiciones experimentales los autorreceptores GABA_B estuvieran completamente activados por el GABA liberado en forma basal de nuestra preparación (Waldmeier et al., 1993). Sin embargo, el hecho de que la síntesis de GABA no se afectó por el (-)baclofen en sinaptosomas (Fig. 15) en los cuales el GABA liberado bajo condiciones basales se diluiría ampliamente en el medio de incubación y de que el CGP 52432, un antagonista selectivo para el receptor GABA_B (Lanza et al., 1993; ver sin embargo Waldmeier et al., 1994) resultara también inefectivo (Fig. 16) hacen poco probable esta posibilidad.

Aunque una aparente falta de acoplamiento entre la activación del receptor GABA_B y la tasa de síntesis del GABA había sido ya sugerida por Potashner (1979), sus resultados fueron poco contundentes pues solo se probó una concentración de (-)baclofen (4 μ M) y el (-)baclofen a dicha concentración no modificó significativamente la liberación de GABA estimulada por K⁺. Los resultados del estudio sistemático reportado en este trabajo sugieren casi definitivamente una falta de un acoplamiento entre la liberación y la síntesis de GABA mediado por la activación de autorreceptores gabaérgicos tipo B.

Es posible, sin embargo que aunque no descritos aún, existan otros tipos de receptores metabotrópicos diferentes a los del tipo B, y por lo tanto no sensibles al (-)baclofen, que estén involucrados en el acoplamiento entre la síntesis y la liberación del GABA.

Nuestros resultados indican, que en el caso de las neuronas gabaérgicas y posiblemente en el caso de las glutamatérgicas, a diferencia de lo que sucede en las neuronas aminérgicas, no existe un acoplamiento entre la liberación y la síntesis del neurotransmisor regulado por un mismo tipo de autorreceptor. Es posible que tal mecanismo sea importante para evitar la depleción del neurotransmisor en el caso de

aquellos sistemas en los que la concentración del neurotransmisor es baja, como ocurre con los sistemas aminérgicos, pero no en el caso de los sistemas aminoacidérgicos, que poseen una concentración intracelular muy elevada de neurotransmisor y que difícilmente se abaten bajo condiciones de actividad nerviosa moderada o aún intensa. En los sistemas aminoacidérgicos, podemos hipotetizar con base en nuestros resultados y en datos ya citados de la literatura (Porter y Martin, 1984, Rimvall y Martin, 1992, Rimvall y Martin, 1994, Rimval et al 1993), que el acoplamiento entre la síntesis y la liberación del neurotransmisor se daría entonces, a través de mecanismos de retroalimentación, fosforilantes o no, pero que se controlan intraterminalmente en base a la concentración del neurotransmisor mismo.

Bibliografía.

Baghdoyan H.A.; Lydic, R. y Fleegal, M.A. (1998) M2 muscarinic autoreceptors modulate acetylcholine release in medial pontine reticular formation.. J. Pharmacol. Exp. Ther. 286: 1466-1452

Bao, J.; Cheung, W. Y. y Wu. J. (1995) Brain L-Glutamate decarboxilase: Inhibition by phosphorylation and activation by dephosphorylation. J. Biol. Chem. 270 (12): 6464-6467

Barral, J.; Toro, S.; Galarraga, E. y Bargas, J. (2000) GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca^{2+} channels. Neurosc. Lett. 283:33-36

Battaglioli, G.; Liu, H. y Martin D.L. (2003) Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase implications for the regulation of GABA synthesis. J Neurochem. 86(4):879-87

Baxter, C.F. (1976) Some recent advances in studies of GABA metabolism and compartmentation. In. Roberts, E., Chase, T.N., and Tower D.B. (Eds). GABA in nervous system function. Raven Press, NY, USA. pp: 61-87

Benjamin, A.M. (1981). Control of glutaminase activity in rat brain cortex in vitro: Influence of glutamate, phosphate, ammonium, calcium and hydrogen ions. Brain Res. 208:363-377

Billinton, A.; Upton, N. y Bowery, N.G. (1999). GABA_B receptor isoforms GBR1a and GBR1b, appear to be associated with pre- and post-synaptic elements respectively in rat and human cerebellum. Br. J. Pharmacol. 126: 1387-1392

Bon, C. y Garlan, M. (1996) Electrophysiological action of GABAB agonists and antagonists in rat dorso-lateral septal neurons in vitro. Br. J. Pharmacol. 118: 961-967

- Bonanno, G. y Raiteri, M. (1992) Functional evidence for multiple γ -aminobutyric Acid_B receptor subtypes in the rat cerebral cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262 (1):114-118
- Bowery, N.G. y Brown, D.A. (1997). Inhibitory synapses. The cloning of GABA_B receptors. *Nature* 386: 223-224
- Brock J.A. (1995) Modulation of neurotransmitter release of by autoreceptors. En Powis D.A., y Bunn S.J. (Eds.) *Neurotransmitter release and its modulation: biochemical mechanism, physiological function and clinical relevance.* pp: 81-103
- Burgoyne, R.D. y Cheek, T.R. (1995) Mechanisms of exocytosis and the central role of calcium. En: Powis, D.A. y Bunn, S.J. (eds.) *Neurotransmitter release and its modulation: biochemical mechanisms, physiological function and clinical relevance.* Cambridge university Press. pp: 7-20
- Carlsson, A. (1975) Receptor-mediated control of dopamine metabolism. In: Usdin, E. y Bunney, W.E. (Eds.) *Pre and Postsynaptic Receptors.* Mercel Dekker, New York pp 49-65
- Chang, J-Y.; Knecht, R. y Braun D.G. (1981) Amino acid analysis at the picomole level: application to the C-terminal sequence analysis of polypeptides. *Biochemichem. J.* 199: 547-555
- Cooper, J.R.; Bloom, F.E. y Roth R.H. (1996) *The Biochemical Basis of neuropharmacology.* Séptima ed. Oxford University press. pp: 9, 45, 75-102
- Deisz, R.A.; Billard, J.M. y Zieglgänsberger, W. (1993) Pre- and postsynaptic GABA_B receptors of rat neocortical neurons differ in their pharmacological properties. *Neuroscience Letters* 154: 209-212
- Deisz, R.A.; Billard, J.M. y Zieglgänsberger, W. (1997) Presynaptic and Postsynaptic GABA_B receptors of neocortical neurons of the rat in vitro: differences in pharmacology and ionic mechanisms. *Synapse* 25: 62-72
- Dutar, P. y Nicoll, R.A. (1988) Pre- and postsynaptic GABA_B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1: 585-591
- Edwards, F.A.; Konnerth, A. y Sakmann, B. (1990) Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J. Physiol.* 430: 213-249
- Elsworth, J.D. y Roth, R.H. (1996) Dopamine autoreceptor pharmacology and function: Recent insights. In Neve K, Neve R (eds) *The Dopamine Receptors.* Humana Press, Totowa NJ pp 223-265

Elsworth, J.D. y Robert, H.R. (1997). Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 144: 4-9

Erlander, M.G. y Tobin, A.J. (1991). The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: A review. *Neurochem. Res.* 16(3): 215-226

Floran, B.; Silva, I.; Nava, C. y Aceves, J. (1988). Presynaptic modulation of the release of GABA by GABA_A receptors in pars compacta and by GABA_B receptors in pars reticulata of the rat substantia nigra. *Eur. J. Pharmacol.* 150: 277-286

Fonnum, F. (1993). Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 60:47-57

Fonnum, E. y Walberg (1973). The concentration of GABA within inhibitory nerve terminals. *Brain Res.* 62: 577-579

Fuxe, K. y Agnati, L.F. (Eds) (1991). Volume transmission in the brain: a novel mechanisms for neural transmission. Raven Press, N.Y. 1991 602 pp

Gähwiler, B.H. y Brown, D.A. (1985) GABA_B-receptor-activated K⁺ current in voltage-clamped CA₃ pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 1558-1562

Gainetdinov, R.R.; Sotnikova, T.D.; Grekhova, T.V. y Rayersky, K.S. (1996) In vivo evidence for the preferential role of dopamine D3 receptor in the presynaptic regulation of dopamine release but not synthesis. *Eur. J. Pharmacol.* 308:261-269

Golsdtein, M. (1995). Long- and short-term regulation of tyrosine hidroxilase. En: Bloom F.E. y Kupfer D.J. (Eds.) *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. Pp: 189-195

Gomez-Lira, G.; Trillo, E.; Ramirez, M.; Asai, M.; Sitges, M. y Gutierrez, R. (2002) The expression of GABA in mossy fiber synaptosomes coincides with the seizure-induced expression of GABAergic transmission in the mossy fiber synapse. *Exp Neurol.* 177(1):276-83

Hashimoto, T. y Kuriyama, K. (1997a) GABA_A-receptor-mediated K⁺-evoked GABA release from globus pallidus-analysis using microdialysis. *Neurochem. Int.* 30 (3): 247-252

Hashimoto, T. y Kuriyama, K. (1997b) In vivo evidence that GABA_B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in rat striatum. *J. Neurochem.* 69: 365-370

Hill, D.R. (1985) GABA_B receptor modulation of adenylate cyclase activity in rat brain slices. *J. Pharmacol.* 84: 249-257

Isomoto, S.; Kaibara, M.; Sakurai-Yamashita, Y.; Nagayama, Y.; Uezono, Y.; Yano, K. y Taniyama, K. (1998). Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABA_B receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 253: 10-15

Jensen, K., Jensen, M. S. y Lambert, J.D.C. (1999) Role of presynaptic L-Type Ca²⁺ channels in GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 81: 1225-1230

Jones, K. A.; Borowsky, B.; Tamm, J.A.; Craig, D.A.; Durkin, M.M.; Dai, M.; Yao, W.J.; Johnson, M.; Gunwaldsen, C.; Huag, L.Y.; Tang, C.; Shen, Q.; Salon, J.A.; Morse, K.; Laz, T.; Smith, K.E.; Nagarathnam, D.; Noble, S.A.; Branchek, T.A. y Gerald, C. (1998) GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nature* 396: 674-678

Jouveneau, A; Billard, J. M.; Haditsch, U.; Mansuy, I. M. y Dutar P (2003). Different phosphatase-dependent mechanisms mediate long-term depression and depotentiation of long-term potentiation in mouse hippocampal CA1 area. *Eur J Neurosci.* 18(5):1279-85

Kajikawa, Y.; Saitoh, N. y Takahashi, T. (2001) GTP-binding protein $\beta\gamma$ subunits mediate presynaptic calcium current inhibition by GABA_B receptor. *PNAS* 98 (14): 8054-8058

Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A. y Schwartz, J.H. (1991) Synaptic transmission. En: Kandel E.R., Schwartz, J.H. y Jessel, T.M. (Eds). *Principles of Neural Science*. 3ra ed. pp: 123-134

Kaneko, T, y Mizuno, N. (1994) Glutamate-synthesizing enzymes in gabaergic neurons of the neocortex: a double immunofluorescence study in the rat. *Neuroscience* 64(4):839-849

Katoh, J.; Taniguchi, H.; Ogura, M.; Miyamoto, K.; Kasuga, M. y Okada, Y. (1994) A Convulsant, 3-mercaptoproponic acid, decreases the level of GABA in pancreatic islets of rat as well as that brain. *Life Science* 54(12): 769-773

Katz, B. (1996). Neural transmitter release: from quantal secretion to exocytosis and beyond. *J Neurocytology* 25: 677-686

Kaupmann, K.; Malitschek, B.; Schuler, V.; Heid, J.; Froestl, W.; Beck, P.; Mosbacher, J., Bischoff, S.; Kulik, A.; Shigemoto, R.; Karschin, A. y Bettler, B. (1998) GABA_B-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396: 683-687

Kebabian, J.W. (1992) The cyclic AMP cascade: A signal transduction system. *Neurotransmissions.* 8(2): 1-4

Kelly, R.B. (1993) Storage and release of neurotransmitters. *Neuron* 10 (suppl.): 43-53.

Kuner, R.; Köhr, G.; Grünewald, S; Einsenhardt, G; Bach, A. y Kornau, H.-C. (1999) Role of heteromer formation in GABA_B receptor function. *Science*, 283: 74-77

- Kuriyama, K.; Hirouchi, M. y Nakayasu, H. (1993) Structure and function of cerebral GABA_A and GABA_B receptors. *Neurosc. Res.* 17: 91-99
- Kvame, E.; Svenneby, G. y Torgner, I.A. (1983) Calcium Stimulation of glutamine hydrolysis in synaptosomes from rat brain. *Neurochem. Res.* 8: 25-38
- Kvame, E.; Torgner, I.A. y Roberg, B. (1991) Evidence indicating that pig renal phosphate-activated glutaminase has a functionally predominant localization in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 266: 13185-13192
- Lamar, C. Jr. (1970) Mercaptopropionic acid: A convulsant that inhibits glutamate decarboxylase. *J. Neurochem.* 17: 165-170
- Langer, S.Z. (1981) Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacological Rev.* 32: 337-362
- Langer, S.Z. (1997) 25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *TiPS* 18: 95-99
- Lanza, M.; Fassio, A.; Gemignani, A.; Bonanno, G. y Raiteri, M. (1993) CGP 52432: A novel potent and selective GABA_B autoreceptor antagonist in rat cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 237: 191-195
- Limberger, N.; Deicher, R. y Starke, K. (1989) Species differences in pre-synaptic serotonin autoreceptors: mainly 5-HT_{1B} but possibly in addition 5-HT_{1D} in the rat, 5-HT_{1D} in the rabbit and guinea pig cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 343: 353-364
- Löscher, W.; Böhme, G.; Müller, F. y Paglinsi, S. (1985) improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal γ -aminobutyric acid in vivo. *J. Neurochem.* 45: 879-889
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J. y Farr, A.L., Randall R (1951) Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
- Martin, D.L. y Martin S.B. (1982) Effect of Nucleotides and other inhibitors on the inactivation of glutamate decarboxylase. *J. Neurochem.* 39: 1001-1008
- Martin, D.L. y Rimvall, K. (1993) Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.* 60: 395-407
- Martin, S.B. y Martin D.L. (1979) Stimulation by phosphate of the activation of glutamate apodecarboxylase by pyridoxyl-5'-phosphate and its implication for the control of GABA synthesis. *J. Neurochem.* 33: 1275-1283

- Matsumoto, R.R. (1989) GABA receptors: are cellular differences reflected in function? *Brain Research Rev.* 14:203-225
- Meller, E.; Goldstein, M. y Bohmaker, K. (1990) Receptor reserve for 5-hydroxytryptamine 1_A -mediated inhibition of serotonin synthesis: possible relationship to anxiolytic properties of 5-hydroxytryptamine 1_A agonists. *Mol. Pharmacol.* 37:231-237
- Mercuri, N.B.; Saiardi, A.; Bonci, A.; Picetti, R.; Calabresi, P.; Bernardi, G. y Borrelli, E. (1997) Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D-2 receptor deficient mice. *Neuroscience* 79: 323-327
- Misgeld, U.; Bijak, M. y Jarolimek, W. (1995) A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiol.* 46: 423-462
- Möhler, H.; Benke, D. y Fritschy, J.-M. (2001). GABA_B-receptor isoforms: molecular architecture and distribution. *Life Sciences* 68: 2297-2300
- Mott, D.D y Lewis D.V. (1994) The pharmacology and function of central GABA_B receptors. *Int. Rev. of neurobiology.* 36: 97-223
- Nerr, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257
- Ng, G.Y.K.; Clark, J.; Coulombe, N.; Ethier, N.; Hebert, T.E.; Sullivan, R.; Kargman, S.; Chateauneuf, A.; Tsukamoto, N.; McDonald, T.; Whiting, P.; Mezey, E.; Johnson, M.P.; Liu, Q.; Kolakowski, L.F. Jr; Evans, J.F.; Bonner, T.I. y O'Neill, G.P. (1999) Identification of a GABA_B receptor subunit, gb2, required for functional GABA_B receptor activity. *J. Biol. Chem.* 274 (12): 7607-7610
- Nishikawa, M.; Hirouchi, M. y Kuriyama, K. (1997) Functional coupling of Gi subtype with GABA_B receptor/adenylyl cyclase system: analysis using a reconstituted system with purified GTP-binding protein from bovine cerebral cortex. *Neurochem. Int.* 31 (1): 21-25
- Obrocea, G.V. y Morris, M.E. (1998) Changes in $[K^+]_o$ evoked by baclofen in guinea pig hippocampus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76: 148-154
- O'Hara, C.M.; Uhland-Smith, A.; O'Malley, K.L. y Todd, R.D. (1996) Inhibition of dopamine synthesis by dopamine D2 and D3 but not D4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 186-192
- Ong, J.; Marino, V.; Parker, D.A.S. y Kerr, D.I.B. (1998) Differential effects of phosphonic analogues of GABA on GABA_B autoreceptors in rat neocortical slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357: 408-412

Ottersen O.P.; Zhang N. Y Walberg, F. (1992) Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neurosci.* 46 (3): 519-534

Paulsen, R.E.; Odden, E. y Fonnum, F. (1988) Importance of glutamine for γ -aminobutyric acid synthesis in rat neostriatum in vivo. *J. Neurochem.* 51: 1294-1299

Peng, L.; Hertz, L., Huang, R; Sonnewald, U.; Petersen, S.B.; Westergaard, N.; Larsson, O y Schousboe, A. (1993) Utilization of glutamine and of TCA cycle constituents as precursors for transmitter glutamate and GABA. *Dev. Neurosci.* 15: 367-377

Pérez de la Mora, M. (1995) Biología de la transmisión sináptica. En: Díaz Zagoya J.C. y Hicks Gomez, J.J. *Bioquímica. Interamericana McGraw-Hill. Segunda edición. México.* pp 464-475

Pérez de la Mora, M.; Aguilar-García, A.; Ramon-Frías, T.; Ramírez-Ramírez., R.; Méndez-Franco, J.; Rambert, F. y Fuxe, K. (1999) Effects of vigilance promoting drug modafinil on the synthesis of GABA and glutamate in slices of rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 259: 181-185

Pérez de la Mora, M.; Hernández-Gómez, A.M.; Méndez-Franco, J. y Fuxe, K. (1993) Cholecystokinin-8 increases K^+ -evoked [3H] γ -aminobutyric acid release in slices from various brain areas. *Eur. J. Pharmacol.* 250: 423-430

Pitler, T.A. y Alger, B.B. (1994) Differences between presynaptic and postsynaptic GABA_B mechanisms in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Neurophysiology* 72 (5): 2317-2327.

Pittaluga, A.; Asaro, D.; Pellegrini, G. y Raiteri, M. (1987) Studies on [3H]GABA and endogenous GABA release in rat cerebral cortex suggest the presence of autoreceptors of the GABA_B type. *European Journal of Pharmacology* 144: 45-52

Porter, T.G. y Martin D.L. (1984) Evidence for feedback regulation of glutamate decarboxylase by γ -aminobutyric acid. *J. Neurochem.* 43: 1464-1467

Porter, T.G. y Martin D.L. (1987) Rapid inactivation of brain glutamate decarboxylase by aspartate. *J. Neurochem.* 48: 67-72

Potashner S.J. (1979) Baclofen: effects on amino acid release and metabolism in slices of guinea pig cerebral cortex. *J Neurochem* 32: 103-109.

Ragozzino, D.; Woodward, R.M.; Murata, Y.; Eusebi, F.; Overman, L.E. y Miledi, R. (1996) Design and in vitro pharmacology of a selective γ -aminobutyric acid_C antagonist. *Mol. Pharmacol.* 50:1024-1030

- Raiteri, M.; Bonnano, G. y Fedele, E. (1989) Release of γ -[³H]aminobutyric acid (GABA) from electrically stimulated rat cortical slices and its modulation by GABA_B autoreceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 646-653
- Rimvall, K. y Martin D.L. (1992). Increased intracellular γ -aminobutyric acid selectively lowers the level of the larger of two glutamate decarboxylase proteins in cultured GABAergic neurons from rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 58: 158-166
- Rimvall, K. y Martin D.L. (1994) The level of GAD₆₇ protein is highly sensitive to small increases in intraneuronal γ -aminobutyric acid levels. *J. Neurochem.* 62: 1375-1381
- Rimvall, K.; Sheikh, S.N. y Martin, D.L. (1993). Effects of increased γ -aminobutyric acid levels on GAD₆₇ protein and mRNA levels in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 60: 714-720
- Salazar, P.; Montiel, T.; Brailowsky, S. y Tapia, R. (1994). Decrease of glutamate decarboxylase activity after *in vivo* cortical infusion of γ -aminobutyric acid. *Neurochem. Int.* 24(4): 363-368
- Santos, A.E.; Carvalho, C.M.; Macedo, T.A. y Carvalho, A.P (1995) Regulation of intracellular [Ca²⁺] and GABA release by presynaptic GABA_B receptors in rat cerebrocortical synaptosomes. *Neurochem. Int.* 27 (4/5): 397-406
- Schaffer, R.A. y Levant, B. (1998) The D-3 dopamine receptor in cellular and organismal function. *Psychopharmacology* 135: 1-16
- Schousboe, A.; Westergaard, N.; Waagepetersen, H.S.; Larsson, O.M.; Bakken I.J. y Sonnewald U. (1997) Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia* 21:99-105
- Schwartz, J.H. (1991a) Chemical messengers: Small molecules and peptides. En: Kandel E.R.; Schwartz, J.H. y Jessel, T.M. (Eds). *Principles of Neural Science*. 3ra ed. pp: 213-224
- Schwartz, J.H. (1991b) Synaptic vesicles. En: Kandel, E.R.; Schwartz, J.H. y Jessel, T.M. (Eds.). *Principles of Neural Science*. 3ra ed. pp: 225-234
- Schwartz, J.H. y Kandel E.R. (1991) Synaptic transmission mediated by second messengers En: Kandel, E.R.; Schwartz, J.H. y Jessel, T.M. (Eds). *Principles of Neural Science*. 3ra ed. pp: 173-193
- Shank, R.P. y Campbell, G.L. (1983) Metabolic precursors of glutamate and GABA. En: Hertz, L. (Ed.) *Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system*. Alan R Liss Inc. NY, USA. pp: 355-369
- Sitges, M.; Dunkley, P.R. y Chiu, L.M. (1995) A role of calium/calmoduline kinase(s) in the regulation of GABA exocytosis. *Neurochem. Res.* 20(3): 245-252

- Sonneward, U.; Westergaard, N.; Schousboe, A.; Svendsen, J.S.; Unsgård, G. y Petersen, S.B. (1993) Direct demonstration by [¹³C]NMR spectroscopy that glutamine from astrocytes is a precursor for GABA synthesis in neurons. *Neurochem. Int.* 22(1):19-29
- Sprouse, J.; Reynolds, L. y Rollema, H. (1997) Do 5-HT_{1B/1D} autoreceptors modulate dorsal raphe cell firing? In vivo electrophysiological studies in guinea pigs with GR127935. *Neuropharmacology.* 36(415): 559-567
- Stjärne, L. (1995) Modulation of neurotransmitter release. En Powis D.A., y Bunn S.J. (Eds.) *Neurotransmitter release and its modulation: biochemical mechanism, physiological function and clinical relevance.* pp: 57-80
- Suzuki, R.; Asami, N.; Amann, E. y Wagatsuma, M. (1995) Sequences of two porcine glutamic acid decarboxylases (65- and 67-kDa GAD). *Gene* 152: 257-260
- Takahashi, T.; Kajikawa, Y. y Tsujimoto, T. (1998) G-Protein-Coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABA_B receptor. *J. Neurosc.* 18 (9): 3138-3146
- Tapia, R. y Sandoval, M.E. (1971) Study on the inhibition of brain glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate oxime-O-acetic acid *J. Neurochem.* 18, 2051-2059
- Thompson, S.M. y Gähwiler B.H. (1992). Comparison of the action of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus *in vitro*. *J. Physiol.* 451: 329-345
- Waldmeier, P.C. y Baumann, P.A. (1990) Presynaptic GABA receptors. *Ann NY Acad Sci* 604: 136-151.
- Waldmeier, P.C.; Hertz, Ch.; Wicki, P.; Grunenwald, Ch. y Baumann P.A. (1993) Autoreceptor-mediated regulation of GABA release: role of uptake inhibition and effects of novel GABA_B antagonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch, Pharmacol.* 347: 514-520.
- Waldmeier, P.C.; Stöckling, K. y Feldtrauer, J-J. (1992) Systemic administration of baclofen and the GABA_B antagonist, CGP 35348, does not affect GABA, glutamate or aspartate in microdialysates of the striatum of conscious rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 345: 548-552
- Waldmeier, P.C.; Wicki, P.; Feldtrauer, J-J.; Mickel, S.J.; Bittiger, H., y Baumann, P.A. (1994) GABA and glutamate release affected by GABA_B receptor antagonists with similar potency: no evidence for pharmacologically different presynaptic receptors. *Br. J. Pharmacol.* 113: 1515-1521
- Wang, X. y Lambert, N.A. (2000) GABA_B receptors couple to potassium and calcium channels on identified lateral perforant pathway projection neurons. *J. Neurophysiol.* 83: 1073-1078

Westernik B.H.C.; De Boer, P.; Timmerman, W. y De Vries, J.B. (1990) In vivo evidence for the existence of autoreceptors on dopaminergic, serotonergic and cholinergic neurons in the brain. *Ann NY Acad Sci* 604: 492-504

Whetzel, S.Z.; Shih, Y.H.; Georgic, L.M.; Akunne, H.C. y Pugsley, T.A. (1997) Effects of dopamine D-3 antagonist PD58491 and its interaction with the dopamine D-3 agonist PD128907 on brain dopamine synthesis in rat. *J. Neurochem.* 69: 2363-2368

White, J.H.; Wise, A.; Main, M.J.; Green, A.; Fraser, N.J.; Disney, G.H.; Barnes, A.A.; Emson, P.; Foord, S.M. y Marshall, F.H. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA_B receptor. *Nature* 396: 679-682

Wojcik, W.J. y Neff, N.H. (1983) γ -aminobutyric acid B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in brain, and in the cerebellum these receptors may be associated with granule cells. *Molecular Pharmacology.* 25: 24-28

Wu, J-Y.; Huang, W-M.; Reed-Fourquet, L.; Bao, J.; Nathan, B.; Wu, E. y Tsai, W. (1991). Structure and function of L-glutamate decarboxylase. *Neurochemical Research* 16 (3): 227-233

Yamada, K.; Yu, B. y Gallagher, J.P. (1999). Different subtypes of GABA_B receptors are present at pre- and postsynaptic sites within the rat dorsolateral septal nucleus. *J. Neurophysiol.* 81:2875-2883.

Zhang, D.; Pan, Z.; Zhang, X.; Brideau, A.D. y Lipton S.A. (1995) Cloning of a γ -aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:11756-11760.

Lack of coupling between GABA release and GABA synthesis in the rat brain via GABA_B autoreceptors

**A. Aguilar-García¹, B. González-Frankenberger¹, T. Ramón-Frías²,
B. J. Méndez-Franco¹, and M. Pérez de la Mora¹**

¹Department of Biophysics, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

²División Académica de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez Autónoma de
Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México

Accepted September 20, 1999

Summary. GABA is synthesized within GABA terminals through a highly compartmentalized process in which glial-derived glutamine is a major precursor and its release is modulated by GABA_B autoreceptors. The aim of this work was to ascertain whether or not GABA synthesis and release are coupled in the rat brain through a GABA_B autoreceptor-mediated modulation. It was found that (–)baclofen (30 μM) reduces the K⁺ stimulated release of [³H]GABA in synaptosomes and prisms (10 μM) from cerebral cortex, while at the same concentrations (–)baclofen failed to modify the synthesis of [³H]GABA from [³H]glutamine in cortical and hypothalamic slices, prisms and in cortical synaptosomes. In this latter preparation, identical results were observed when (–)baclofen was added to Krebs-Tris media, containing 5 or 15 mM K⁺ concentration. In agreement with these latter results, glutamic acid decarboxylase (GAD) activity from cortical and hypothalamic prisms was not affected by 1–100 μM (–)baclofen. Similar results on GABA synthesis were also observed when 1–100 μM 3-aminopropyl(methyl)-phosphinic acid or GABA was used instead of (–)baclofen to stimulate GABA_B autoreceptors. [³H]GABA release, [³H]GABA synthesis from [³H]glutamine and GAD activity were also insensitive to the action of the GABA_B antagonist CGP 52432 (10–100 μM). Likewise, muscimol (0.3–100 μM) did not affect GABA synthesis. Our results indicate that unlike GABA release, GABA synthesis is not modulated by GABA_B autoreceptors.

Keywords: Amino acids – GABA-synthesis – GABA-release – GABA – (–)Baclofen – GABA_B autoreceptors – CGP 52432 – Rat brain

Introduction

Neurotransmitter release, a process of paramount importance in synaptic function, is a tightly modulated mechanism. Considerable evidence has

accumulated during the last years indicating that presynaptic autoreceptors (Carlsson, 1975) play a major modulatory influence on the release of a number of neurotransmitters, for example dopamine (DA; Romo et al., 1986; Elsworth and Roth, 1996), serotonin (Engel et al., 1986; Limberger et al., 1989; Rollema et al., 1996), noradrenaline (Kirpehar and Puig, 1971) acetylcholine (Nordström and Bartfai, 1980; Baghdoyan et al., 1998), glutamate (Lovinger, 1991; Herrero et al., 1992; Cochilla and Alford, 1998) and GABA (Raiteri et al., 1989; Waldmeier and Baumman, 1990; Langer, 1997). Moreover within the aminergic neuronal systems, the same type of autoreceptor modulates neurotransmitter release and neurotransmitter synthesis (Carlsson, 1975; Meller et al., 1990; Westernik et al., 1990; Elsworth and Roth, 1996; Gainetdinov et al., 1996); this indicates the existence of a coupling between neurotransmitter release and synthesis. In support of this comodulation, it has been shown that the activation of DA D₂ type autoreceptors decreases tyrosine hydroxylase (TH) activity and DA release. TH inhibition seems to occur as a result of a modification of its phosphorylation state (Wolf and Roth, 1990; Goldstein, 1995) and it has been shown to be responsible for a similar reduction (50%) in the quantal size of the DA released (Pothos et al., 1998).

In regard to the GABA system, several findings suggest that a similar comodulation may exist. Thus, metabotropic GABA_B autoreceptors regulate GABA release (Langer, 1977; Raiteri et al., 1989; Waldmeier and Baumman, 1990; see also Bowery, 1993 for a review on GABA_B receptors) and glutamic acid decarboxylase (GAD), the enzyme responsible for the rate-limiting step in the synthesis of GABA, is also modulated through a putative phosphorylation-dephosphorylation cycle (Bao et al., 1995). Furthermore, it has been reported that the activation of GABA_B receptors by the GABA agonist (-)baclofen (Bowery, 1993) inhibits the calcium and depolarization dependent-TH activity in the striatum of the rat (Arias-Montaña et al., 1991). The aim of this work is to study whether GABA release and GABA synthesis are comodulated by metabotropic GABA_B autoreceptors. The participation of GABA_A autoreceptors on this hypothetical comodulation is also explored.

Material and methods

Animals and brain preparations

Male Wistar rats (180–200 g body weight) were used. The animals were kept on a normal 12:12 h light-dark cycle and had food and water *ad libitum*. Animals were killed by decapitation and their brains were quickly excised from the skull and submerged into a cold saline solution. The hypothalamus and the frontoparietal cerebral cortex were manually dissected out from coronal slices with the aid of two parallel razor blades positioned in the hypothalamus between the preoptic and the mammillary bodies, and in the cerebral cortex between the rostral border of the optic chiasma and an imaginary line drawn 3 mm ahead. Hypothalamic slices (400 μm) were obtained with a Mc Ilwain tissue chopper by slicing the hypothalamus perpendicularly to its ventral side. Cortical and hypothalamic prisms were obtained by slicing (300 μm) each region in two perpendicular directions. Cortical synaptosomes were prepared by the method of Löscher et al. (1985) and suspended in a standard Krebs-Tris medium of the following composition: 124 mM

NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O, 35 mM Trizma base, 10 mM glucose and 0.75 mM CaCl₂, pH 7.2 gassed with 100% O₂.

[³H]GABA release

[³H]GABA release was measured in the presence and in the absence of (–)baclofen essentially as described by Pérez de la Mora et al. (1993). Cortical prisms were equilibrated for 30 min at 37°C in a Krebs-Tris medium. After this time [³H]GABA (45 Ci/mmol specific activity) was added to a final concentration of 0.4 μM and the incubation was continued for 15 min to allow sufficient neuronal uptake of [³H]GABA. Hundred μM β-alanine was present during this period to prevent the [³H]GABA uptake by the glia (Schon and Kelly, 1974; Raiteri et al., 1989). At the end of this loading period, the prisms were transferred to superfusion chambers with a volume of 0.25 ml and superfused at a flow rate of 1.5 ml/min with standard Krebs-Tris medium supplemented with 10 μM aminooxyacetic acid. After 40 min new Krebs-Tris medium that contained (–)baclofen or CGP 52432 was superfused into the experimental chambers. Ten min afterwards the prisms in control and in experimental chambers were stimulated with 15 mM or 30 mM K⁺ (CGP 52432 experiments) for 10 min and the superfusion was continued as before for 5 min. To prevent [³H]GABA breakdown 10 μM aminooxyacetic acid was present from the [³H]GABA loading till the end of the superfusion. When the KCl concentration was increased in the media, the isotonicity was maintained by reducing the NaCl concentration. (–)Baclofen or CGP 52432 was present in the superfusion media of the experimental chambers from its introduction 10 min before the stimulation until the end of the experiment. Nipecotic acid was present during the superfusion to prevent [³H]GABA uptake into GABA terminals (Krogsgaard-Larsen and Johnston, 1975). Equilibration, loading and superfusion were always carried out at 37°C. Fractions were collected every minute after 15–25 min of superfusion; at the end of the experiment the prisms were digested in 0.5 ml 1% sodium dodecyl sulfate. The radioactivity in both prisms and fractions was counted by scintillation spectrometry in vials containing 5 ml Tritosol.

To measure release from synaptosomes 300 μg synaptosomal protein was incubated in a Krebs-Tris medium similar to that used for the incubation of brain prisms. At the end of the incubation period, aliquots of the synaptosomal suspension were distributed on Millipore filters (0.65 μm) and superfused as described originally by Raiteri et al. (1974) with some modifications. In particular, the filters containing the trapped synaptosomes were cut into pieces so that they could be introduced into 0.25 ml superfusion chambers. Superfusion was carried out as for the experiments of [³H]GABA release from prisms.

We have already shown (Pérez de la Mora et al., 1993) that under the above conditions, 90% of the radioactivity released by the K⁺ stimulation comigrated with authentic GABA and that 80% of the radioactivity stored within the prisms was [³H]GABA. Thus, we will refer to the radioactivity released during the superfusion and the radioactivity present in the preparation used, at the onset of K⁺ stimulation as [³H]GABA. [³H]GABA released under the above conditions has been shown to be a least 70% Ca²⁺ dependent (Pérez de la Mora et al., 1993). The efflux of [³H]GABA was expressed in percent of the total [³H]GABA existing in the brain preparation at the onset of the K⁺-stimulation.

GABA synthesis

Overall [³H]GABA synthesis was determined from the incorporation of radioactivity from [³H]glutamine into [³H]GABA. GAD activity within brain prisms was also evaluated under control and experimental conditions. The methodology used for both procedures has been published in detail elsewhere (Pérez de la Mora et al., 1999). To measure the overall [³H]GABA synthesis from [³H]glutamine, prisms (0.3–0.7 mg protein) were equilibrated at 37°C for 40 min in 450 μl standard Krebs-Tris medium in

chambers filled with latex stoppers which allow the introduction of syringe needles to inject substances or to change the atmosphere of the chamber. Five μCi [^3H]glutamine (30 Ci/mmol) diluted in 50 μl standard Krebs-Tris medium were then injected to reach a 0.33 μM final concentration and the incorporation of radioactivity from [^3H]glutamine into [^3H]GABA was allowed to proceed for 10 min. [^3H]GABA synthesis was stopped by transferring the incubation chambers into an ice-salt-cooled water bath set at 0°C and by aspirating the radioactive medium. The prisms were washed with 3 ml portions of ice cold non-radioactive medium, followed by sonication in 1.5 ml of 80% ice-cold ethanol. After centrifugation (3,000 rev/min; 10 min), the supernatants were extracted with 5.0 ml chloroform and the radioactive amino acids were recovered from the water phase formed after a second centrifugation (3,000 rev/min; 10 min). A 100 μl aliquot from the water phase was freeze-dried and used for analysis. Blanks were made by cooling the incubation mixture just before the addition of [^3H]glutamine. Control experiments showed that the incorporation of radioactivity from [^3H]glutamine in [^3H]GABA was linear for at least 20 min. [^3H]GABA, was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Beckman (System Gold) chromatograph. The procedure involved reversed phase chromatography carried out under gradient conditions in a Ultrasphere column (ODS-DAB C18; 4.6 \times 250 mm; Beckman Instruments) after precolumn derivatization. Dabsyl chloride (4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride) derivatization was performed using a Beckman Instruments kit. The mobile phase used to separate [^3H]GABA was formed by mixing phase A (0.01 M sodium citrate pH 6.5 in 4% dimethyl formamide (DMF)) and phase B (70% acetonitrile in 4% DMF) in a gradient in which the concentrations of phase A changed from 71% at 0 time to 41% in 12 min and then to 31% in 3 min. The column was washed with phase B only (4 min) and re-equilibrated to 71% phase A. The flow rate was, 1.4 ml/min. Under the above conditions [^3H]GABA appear in the chromatogram separated from all other amino acids as a sharp peak. The detection limit was 5 pmol GABA in the detector. The radioactivity in GABA was measured by scintillation spectrometry after addition of Tritosol in calibrated effluents of the column after their HPLC separation. The effects of the different treatments were evaluated from changes observed in the respective specific activities (dpm/pmol GABA). Control experiments showed that under the labeling conditions described 10 mM 3-mercaptopropionic acid, a well known GAD inhibitor (Lamar, 1970) decreased the incorporation of radioactivity from [^3H]glutamine into [^3H]GABA by 70% in cortical slices.

Glutamic acid decarboxylase (GAD) activity was measured radioisotopically in slices essentially as described by Pérez de la Mora et al. (1992), but using larger tubes to contain both the prisms and a small tube filled with 100 μl benzethonium chloride to trap the $^{14}\text{CO}_2$ evolved from L-[^{14}C] glutamic acid during the reaction. The prisms (9–15 mg protein) were suspended and equilibrated at 37°C for 30 min in a standard Krebs-Tris medium. Drugs dissolved in the same medium were added to the desired concentrations. Five minutes later the reaction was initiated by the addition of DL[^{14}C]glutamic acid (5.46 Ci/mol; L form) to give a 3.6 μM concentration in 500 μl final volume; the reaction was stopped 20 min later. No pyridoxal phosphate was added to the incubation medium, since control experiments showed that under the conditions of the assay pyridoxal phosphate does not stimulate GAD activity. Time-course experiments showed that GAD activity is linear for at least 45 min; and other experiments showed that GAD activity is indeed measured within the slices.

Protein measurement

Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951).

Statistics

Parametric procedures were used. For the release experiments, the effects of (–)baclofen on the K^+ -stimulated release of [^3H]GABA were evaluated by comparing both the height,

and the area under the curve for the K⁺-stimulated peak of experimental vs control superfusions. Student's "t" test was used to evaluate statistical significance. GABA synthesis experiments were evaluated by one-way, ANOVA analysis followed, when needed, by Dunnet's post-hoc test.

Material

Since in commercial [³H]glutamine a [³H]pyroglutamic-like compound is formed, a fresh lot of [3,4-³H]glutamine (NEN, Dupont; Boston Ma, USA) was used for the [³H]GABA synthesis experiments. [1-¹⁴C] DL-glutamic acid was also from NEN. CGP 52432 ([3-[[[(3,4-dichlorophenyl)methyl]amino]propyl](diethoymethyl)phosphinic acid) was a generous gift from Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland. R-(+)-baclofen hydrochloride (equivalent to (-)-baclofen, free base), and 3-amino-propyl(methyl)phosphinic acid (3-APMPA) were purchased from Research Biochemicals International (RBI; Natick Ma, USA). Muscimol was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis Missouri, USA) Tritosol was prepared according to Fricke (1975). All other chemicals were obtained from local sources and were of the purest grade available.

Results

Effects of GABA_B receptor agonists on [³H]GABA release

In agreement with previous work (Langer, 1977; Waldmeier and Baumman, 1970; Raiteri et al., 1989), the GABA_B receptor agonist (-)-baclofen (10 μM) did not affect the basal [³H]GABA release in cortical prisms, instead it diminished, in a statistical significant way, its K⁺-stimulated release (Fig. 1A). A similar result was also observed when synaptosomes from the frontoparietal cerebral cortex were superfused with 30 μM (-)-baclofen (Fig. 1B).

Effects of GABA receptor ligands on tissue GABA levels

(-)-Baclofen, 3-APMPA, CGP52432 and muscimol at the concentrations used in this work did not affect GABA levels within prisms and slices from frontoparietal cerebral cortex and hypothalamus (data not shown). GABA had no effect when it was used at low concentrations (10 μM) (data not shown), but it increased significantly the GABA content of cortical (14.4 (control) vs 23.6 (GABA), nmol/mg of prot.) and hypothalamic prisms (195.6 ± 7.9 (control) vs 265.6 ± 18.6 (GABA) nmol/mg of prot.; p < 0.01, n + 4) when these preparations were incubated in the presence of 100 μM GABA.

Effects of GABA_B receptor agonists on the synthesis of [³H]GABA from [³H]glutamine

The incorporation of radioactivity from [³H]glutamine into [³H]GABA in cortical prisms was not affected by several concentration (1–100 μM) of (-)-baclofen (Fig. 2A). Furthermore, 3-APMPA, a more potent GABA_B receptor agonist (Bon, 1996) also failed to affect the incorporation of radioactivity from [³H]glutamine into [³H]GABA (Fig. 2B).

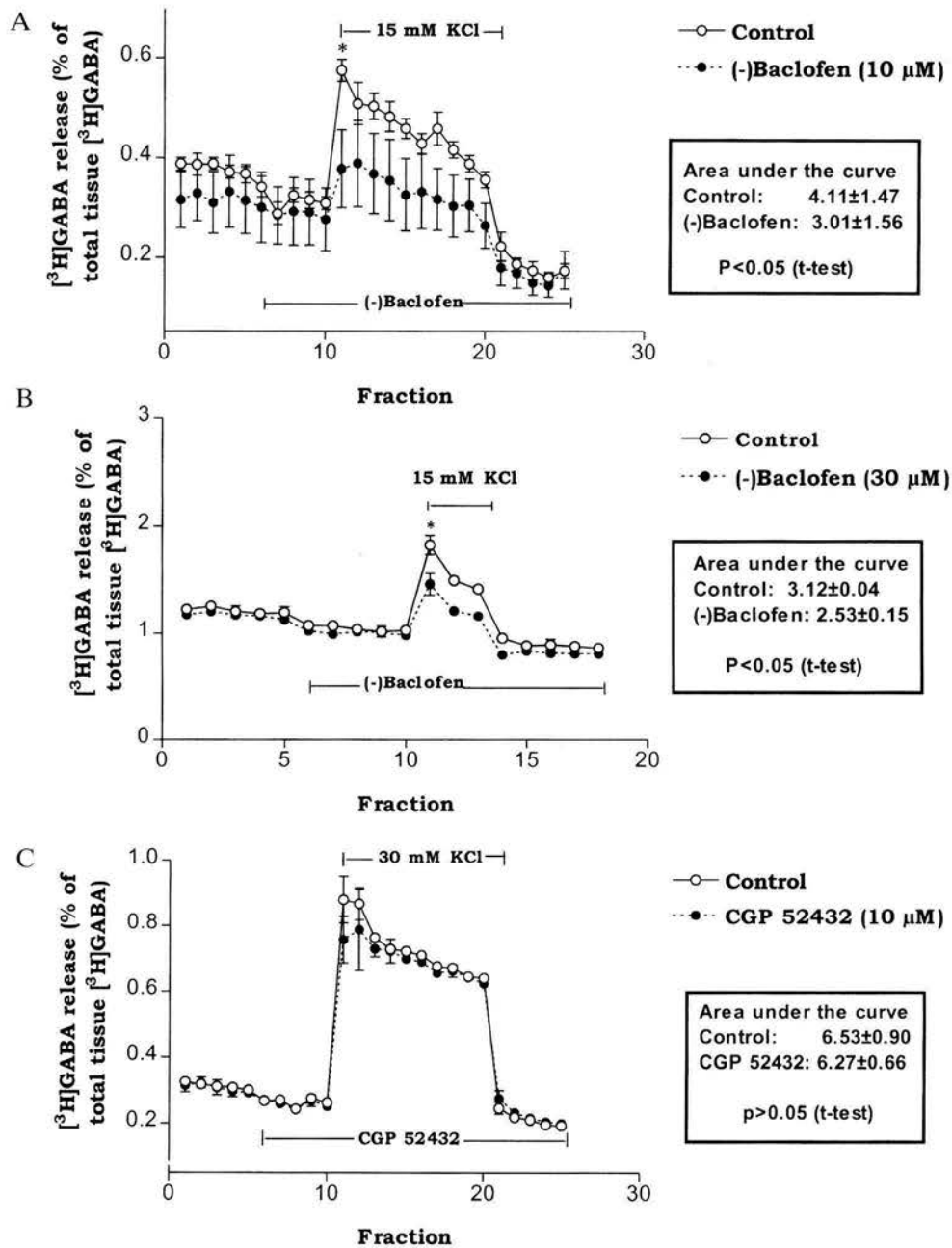


Fig. 1. Effects of (-)baclofen and CGP52432 on ^{3}H GABA release from rat cortical prisms and synaptosomes. Prisms and synaptosomes were loaded with ^{3}H GABA and then superfused with a Krebs-Tris medium. GABA release was evoked by exchanging the media for Krebs-Tris media containing the concentration of KCl indicated. Media containing (-)baclofen or CGP 52432 were used to superfuse the experimental chambers for the period of time indicated. ^{3}H GABA release is expressed in percent of the radioactivity present in the preparation at the moment of its stimulation. Values are means \pm SEM from 3–4 separate experiments carried out in triplicates. The area under the curve for the peak of the K^{+} -stimulated release of ^{3}H GABA was obtained for each superfusion and the difference between control and experimental values was evaluated by means of the Student's "t" test. Standard error bars were omitted in those points where their size was smaller than the corresponding symbols. **A** and **C**: ^{3}H GABA release from cortical prisms. **B**: ^{3}H GABA release from cortical synaptosomes. For a complete description of the experimental procedure see Material and methods

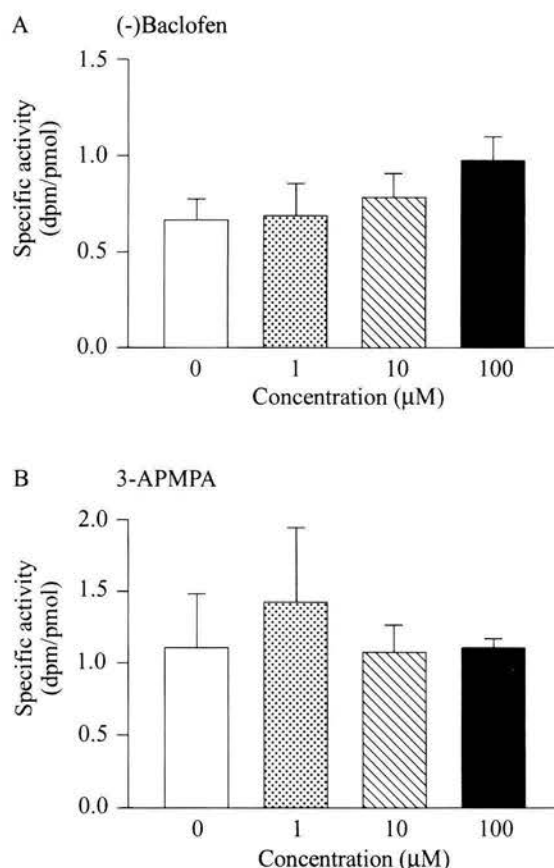


Fig. 2. Effects of (-)baclofen and 3-APMPA on the synthesis of [³H]GABA from [³H]glutamine in prisms from the rat frontoparietal cerebral cortex. Prisms were incubated in Krebs-Tris medium at 37° with [³H]glutamine (0.33 μM; 30 Ci/mmol) for 10 min following an equilibration period of 40 min. The radioactivity incorporated into [³H]GABA was determined as described under Material and methods. Values are given as means ± SEM of 3 separate experiments carried out in triplicates. For other details see text. One way ANOVA analysis showed no statistical significance

To eliminate the possibility that regional differences might be responsible for the lack of effects of GABA_B receptor agonists on the synthesis of [³H]GABA from [³H]glutamine, the effect of (-)baclofen on the incorporation of radioactivity from [³H]glutamine into [³H]GABA was determined in prisms and hypothalamic slices. As shown in Fig. 3, 10 μM (-)baclofen did not modify the synthesis of [³H]GABA from [³H]glutamine in slices from rat hypothalamus. Similar results were obtained in hypothalamic prisms (data not shown).

As shown in Fig. 1A and B only the K⁺-stimulated release of [³H]GABA was modulated by (-)baclofen. Thus the effects of this GABA_B receptor agonist were studied on the synthesis of [³H]GABA from [³H]glutamine under depolarizing conditions. The incorporation of radioactivity from [³H]glutamine into [³H]GABA was not modulated by (-)baclofen under any K⁺ concentration (Fig. 4).

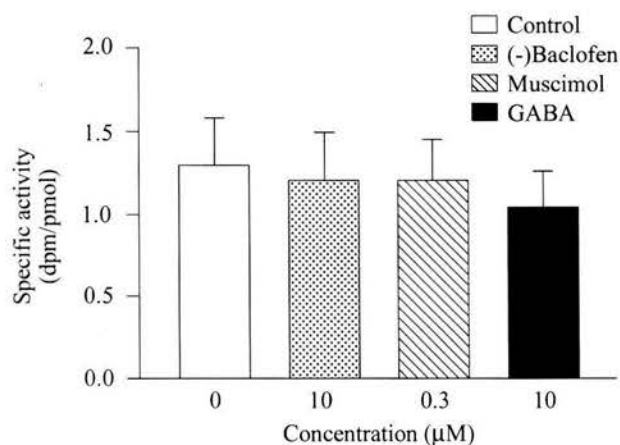


Fig. 3. Effects of (-)baclofen, muscimol and GABA on the synthesis of [^3H]GABA from [^3H]glutamine in slices from the rat hypothalamus. [^3H]GABA synthesis from [^3H]glutamine was measured in hypothalamic slices as for cortical prisms. See Fig. 2 and Material and methods for details. Values are given as means + SEM of 4 experiments carried out in triplicates. One way ANOVA analysis showed no statistical significance

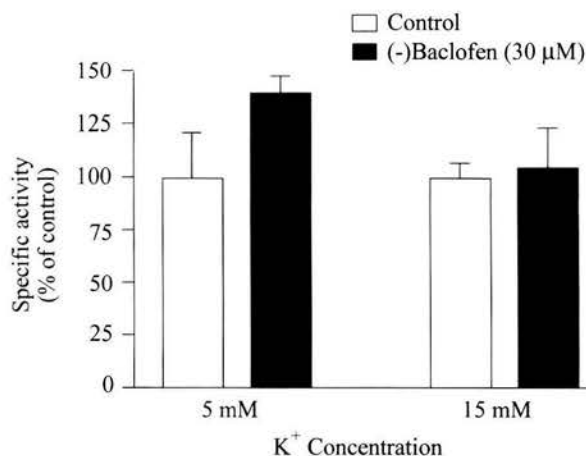


Fig. 4. Effects of (-)baclofen on the synthesis of [^3H]GABA from [^3H]glutamine in synaptosomes from the rat frontoparietal cerebral cortex. Synaptosomes were obtained by the method of Löscher et al. (1985) and resuspended in Krebs-Tris medium. Aliquots (0.3–0.7 mg protein) were equilibrated in the same medium and after 40 min the Krebs-Tris media were exchanged for fresh Krebs-Tris media containing either 5.0 mM KCl + [^3H]glutamine (30 Ci/mmol; 0.33 µM) or 15 mM KCl + [^3H]glutamine (30 Ci/mmol; 0.33 µM). The radioactivity incorporated into [^3H]GABA was determined as described under Material and methods. To normalize the data the results are shown as % of control values and are given as means + SEM of 3 experiments carried out in duplicates. One-way ANOVA analysis showed no statistical significance. Absolute specific activity values for the control 5 mM KCl and 15 mM KCl groups were 4.24 ± 2.03 and 2.89 ± 1.50 dpm/pmol respectively

Effects of muscimol and GABA on the synthesis of [³H]GABA from [³H]glutamine

In order to explore a possible modulation of GABA synthesis by presynaptic GABA_A autoreceptors (Mitchell and Martin, 1978; Floran et al., 1988; Hashimoto and Kuriyama, 1997), the effects of the GABA_A agonist muscimol (Simmonds, 1983) on the incorporation of radioactivity from [³H]glutamine into [³H]GABA were also studied. In addition, the effects of GABA on its own synthesis from [³H]glutamine were evaluated. Fig. 3 shows that neither muscimol (10 μM) nor GABA (10 μM) affected the synthesis of [³H]GABA from [³H]glutamine in slices of rat hypothalamus. However, there was a trend for a decrease in [³H]GABA synthesis both in hypothalamic and in cortical prisms when higher (100 μM) GABA concentrations were used. In the hypothalamus the control and GABA group values were 0.5 ± 0.17 and 0.35 ± 0.08 dpm/pmol respectively; n = 4. In the cerebral cortex the respective values were 1.43 and 0.92 dpm/pmol (one experiment in quintuplets).

Effects of GABA_B and GABA_A receptor agonists on GAD activity

To further study a possible modulation of GABA synthesis by presynaptic GABA autoreceptors GAD activity was measured within cortical and hypothalamic prisms in the presence of GABA_B and GABA_A receptor agonists. Neither, (-)baclofen, muscimol, or GABA showed any modulatory effect on cortical GAD activity (Fig. 5). Identical results were also obtained in prisms from hypothalamus (data not shown).

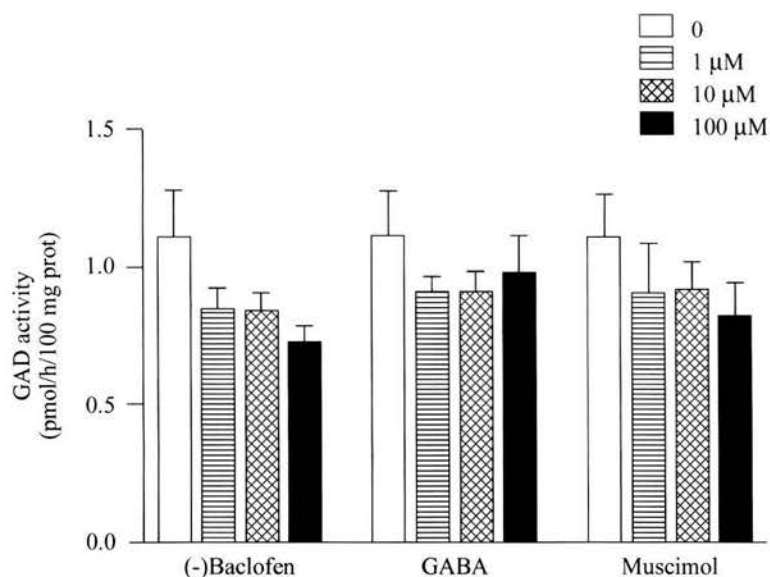


Fig. 5. Effects of (-)baclofen, GABA and muscimol on GAD activity in prisms from the rat frontoparietal cerebral cortex. GAD activity was measured radioisotopically by measuring the evolution of ¹⁴C₂ from [¹⁴C]glutamic acid in the presence of different concentrations of either (-)baclofen, GABA or muscimol. Data are the mean ± SEM of 5 different experiments carried out in triplicates. See Material and methods for methodological details. One-way ANOVA analysis showed no statistical significance

Effects of CGP 52432 on [³H]GABA release, GAD activity and [³H]GABA synthesis from [³H]glutamine

The rule out the possibility that the lack of effect of (–)baclofen on GABA synthesis resulted from a saturation of GABA_B autoreceptors by GABA release under basal conditions (Waldmeier et al., 1993) which may have prevented any further autoreceptor activation by (–)baclofen, we studied the effects of CGP 52432, a selective GABA_B receptor antagonist (Lanza et al., 1993), on [³H]GABA release, [³H]GABA synthesis from [³H]glutamine and GAD activity in cortical prisms. Furthermore, in all the experiments described in this section a 30 mM K⁺ concentration was used in an attempt to induce a compensatory increase in GABA synthesis as a consequence of a deeper depletion in the releasable pool of GABA. As indicated in Fig. 1C, CGP 52432 did not affect [³H]GABA release. Likewise, [³H]GABA synthesis from [³H]glutamine (Fig. 6A) and GAD activity (Fig. 6B) were not modified.

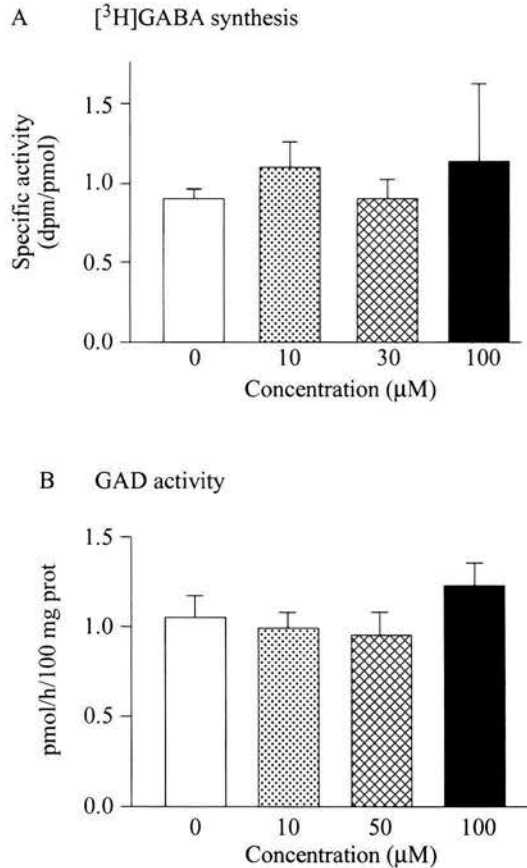


Fig. 6. Effects of CGP 52432 on the synthesis of [³H]GABA from [³H]glutamine and on GAD activity in prisms from the rat frontoparietal cerebral cortex. [³H]GABA synthesis and GAD activity were measured as described in Material and methods. Values are given as means ± SEM of 5 different experiments carried out in triplicates. No statistical significant differences (ANOVA analysis) were found on the effects of CGP 52432 on both [³H]GABA synthesis from [³H]glutamine and GAD activity

Discussion

As documented above a tight coupling between neurotransmitter release and synthesis seems to occur within the aminergic neuronal systems (Carlsson, 1975; Meller et al., 1990; Westernik et al., 1990; Goldstein, 1995; Elsworth and Roth, 1996; Gainetdinov et al., 1996). In these systems, and particularly within the dopaminergic one, the activation of a single or a set of different presynaptic metabotropic autoreceptor subtypes leads to a decrease in both neurotransmitter release and synthesis (Goldstein, 1995; Elsworth and Roth, 1996; Gainetdinov et al., 1996; Mercuri et al., 1997; Whetzel et al., 1997; Schaffer and Levant, 1998). In this paper, we studied in prisms, slices and synaptosomes from two brains regions the effects of several concentrations of two GABA_B receptor agonists and one antagonist on both [³H]GABA release and GABA synthesis. The purpose was to ascertain if the same type of coupling exists within the gabaergic system. Since GABA synthesis is a highly compartmentalized process (Van den Berg et al., 1977; Schousboe et al., 1997) and glutamine seems to be a major GABA precursor (Paulsen et al., 1988) we measured, as indexes of GABA synthesis, the incorporation of radioactivity from [³H]glutamine into [³H]GABA as well as the GAD activity within brain preparations which still retain a great deal of compartmentation (Balázs et al., 1970).

In agreement with work published by many laboratories (i.e. Floran et al., 1988; Waldmeier et al., 1992; Lanza et al., 1993) (-)baclofen decreased the K⁺ stimulated [³H]GABA release from cortical prisms (Fig. 1A) and synaptosomes (Fig. 1B). However it failed to influence [³H]GABA synthesis from [³H]glutamine in cortical (Fig. 2A) and hypothalamic prisms (data not shown) as well as in hypothalamic slices (Fig. 3). Furthermore 3-APMPA (1–100 μM), a more potent GABA_B receptor agonist (Bon et al., 1996) also failed to modulate [³H]GABA synthesis from [³H]glutamine in cortical prisms. In line with these last results (-)baclofen (1–100 μM) did not affect GAD activity in cortical (Fig. 5) and hypothalamic prisms (data not shown). The possibility that either regional differences might be involved in the lack of effects of (-)baclofen on GABA synthesis, or that GABA_B agonists only modulate GABA synthesis under conditions of stimulated GABA release seems unlikely, since similar negative results were observed in cortex and hypothalamus and at low (5 mM) or high (15 mM) K⁺ concentrations (Fig. 4). An alternative explanation for the lack of effects of (-)baclofen on GABA synthesis in slices and prisms might be that in our conditions GABA_B autoreceptors are already fully activated by basal GABA release (Waldmeier et al., 1993). However, the fact that GABA synthesis is not affected by (-)baclofen in synaptosomes (Fig. 4) in which the GABA released under basal conditions is highly diluted and washed by the superfusion and that CGP 52432, a selective GABA_B receptor antagonist (Lanza et al., 1993; see however Waldmeier et al., 1994), did not affect neither [³H]GABA release (Fig. 1C), nor GABA synthesis (Fig. 6) renders this possibility also unlikely.

An apparent lack of coupling between GABA_B receptor activation and the rate of GABA synthesis has been already reported by Potashner (1997), who found that 4 μ M baclofen did not modify the concentration and the labeling of [¹⁴C]GABA from [¹⁴C]glucose. However, the issue of the possible coupling between GABA release and synthesis is far from settled, since in those experiments only one baclofen concentration was tested; moreover baclofen failed to modify significantly the electrically stimulated GABA release, as it usually does (this paper and i.e. Floran et al., 1988; Raiteri et al., 1989; Waldmeier and Baumman, 1990). The results of the systematic study reported in this paper thus suggest the lack of a coupling between the GABA release and its synthesis.

Since it has been reported that GABA_A autoreceptors modulate GABA release (Mitchell et al., 1978; Floran et al., 1988; Hashimoto and Kuriyama, 1997), we explored the possibility that GABA synthesis may be modulated by the GABA_A receptor agonist muscimol. Our results show that GABA_A autoreceptor mechanisms are not involved in the regulation of GABA synthesis, since muscimol failed to affect both [³H]GABA synthesis from [³H]glutamine in slices of hypothalamus (Fig. 3), and GAD activity within cortical (Fig. 5) and hypothalamic (data not shown) prisms. It is clear however that more studies are needed before a modulatory effect of GABA_A autoreceptors on GABA synthesis can be discarded. GABA seems to be also unable to modify its own synthesis, since only a trend for a decrease in the labeling of [³H]GABA from [³H]glutamine was found at the highest (100 μ M) GABA concentration used.

In conclusion, the results of these paper, based on the pharmacological actions of (-)baclofen, 3-APMPA and CGP 52432, support a lack of coupling between GABA release and synthesis mediated through a pharmacologically identical GABA_B autoreceptor. However, considerable evidence suggests that different subtypes of DA D₂ receptors couple the activation of DA D₂ autoreceptors to modifications in either their release or synthesis (Goldstein, 1995; Elsworth and Roth, 1996; Gainetdinov et al., 1996; O'Hara et al., 1996; Mercuri et al., 1997; Whetzel et al., 1997; Schaffer and Levant, 1998). Likewise, recent expression cloning experiments have shown the existence of at least two metabotropic GABA_B receptors (Kaupmann et al., 1997) which may have several splice variants. Therefore, it is conceivable that GABA release and synthesis may be coupled to different subtype of metabotropic GABA_B autoreceptor.

Acknowledgments

The authors are indebted to Dr. Armando Gómez-Puyou for helpful discussions, critical reading and suggestions during the preparation of this manuscript. The skillful secretarial assistance of Mrs. Edith Ramos and the financial support of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México (Grant: 26370-N) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) UNAM, México (Grant: IN 230198) are gratefully acknowledged.

References

- Arias-Montañó JA, Martínez-Fong, Aceves J (1991) γ -Aminobutyric acid (GABA_B) receptor-mediated inhibition of tyrosine hydroxylase activity in the striatum of rat. *Neuropharmacol* 30: 1047–1051
- Baghdoyan HA, Lydic R, Fleegal MA (1998) M2 muscarinic autoreceptors modulate acetylcholine release in the medial pontine reticular formation. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1446–1452
- Balázs R, Machiyama Y, Hammond BJ, Julian T, Richter D (1970) The operation of the γ -aminobutyric acid cycle in brain tissue in vitro. *Biochem J* 116: 445–467
- Bao J, Cheung WY, Wu J-Y (1995) Brain L-glutamate decarboxylase. Inhibition by phosphorylation and activation by dephosphorylation. *J Biol Chem* 270: 6464–6467
- Bon C, Garlan M (1996) Electrophysiological action of GABA_B agonists and antagonists in rat dorso-lateral septal neurons in vitro. *Br J Pharmacol* 118: 961–967
- Bowery NG (1993) GABA_B receptor pharmacology. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 33: 109–147
- Carlsson A (1975) Receptor-mediated control of dopamine metabolism. In: Usdin E, Bunney WE (eds) *Pre and postsynaptic receptors*. Marcel Dekker, New York, pp 49–65
- Cochilla AK, Alford S (1998) Metabotropic glutamate receptor mediated control of neurotransmitter release. *Neuron* 20: 1007–1016
- Elsworth JD, Roth RH (1996) Dopamine autoreceptor pharmacology and function: recent insights. In: Neve K, Neve R (eds) *The dopamine receptors*. Humana Press, Totowa NJ, pp 223–265
- Engel G, Göthert M, Hoyer D, Schlicker E, Hillenbrand K (1986) Identity of inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine (5-HT) autoreceptors in the rat brain cortex with 5HT_{1B} binding sites. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 332: 1–7
- Floran B, Silva I, Nava C, Aceves J (1988) Presynaptic modulation of the release of GABA by GABA_A receptors in pars compacta and by GABA_B receptors in pars reticulata of the substantia nigra. *Eur J Pharmacol* 150: 277–286
- Fricke U (1975) Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Anal Biochem* 63: 555–558
- Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Grekhova TV, Rayersky KS (1996) In vivo evidence for the preferential role of dopamine D3 receptor in the presynaptic regulation of dopamine release but not synthesis. *Eur J Pharmacol* 308: 261–269
- Goldstein M (1995) Long- and short-term regulation of tyrosine hydroxylase. In: Bloom FE, Kupfer DJ (eds) *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. Raven Press, New York, pp 189–195
- Hashimoto T, Kuriyama K (1997) GABA_A-receptor mediated K⁺-evoked GABA release from globus pallidus – Analysis using microdialysis. *Neurochem Int* 30: 247–252
- Herrero I, Miras-Portugal MT, Sánchez-Prieto J (1992) Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. *Nature* 360: 163–166
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B (1997) Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386: 239–246
- Kirpehar SM, Puig M (1971) Effect of flow-step on noradrenaline release from normal spleens treated with cocaine phentolamine or phenoxybenzamine. *Br J Pharmacol* 43: 359–369
- Krogsgaard-Larsen P, Johnston GAR (1975) Inhibition of GABA uptake in rat brain slices by nipecotic acid, various isoxazoles and related compounds. *J Neurochem* 25: 797–802
- Lamar C (1970) 3-Mercaptopropionic acid: a convulsant that inhibits glutamate decarboxylase. *J Neurochem* 17: 165–170

- Langer SZ (1997) 25 Years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *TIPS* 18: 95–99
- Lanza M, Fassio A, Gemignani A, Bonanno G, Raiteri M (1993) CGP 52432: A novel potent and selective GABA_B autoreceptor antagonist in rat cerebral cortex. *Eur J Pharmacol* 237: 191–195
- Limberger N, Deicher R, Starke K (1989) Species differences in pre-synaptic serotonin autoreceptors: mainly 5HT_{1b} but possibly in addition 5HT_{1D} in the rat, 5HT_{1D} in the rabbit and guinea pig cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343: 353–364
- Löscher W, Böhme G, Müller F, Paglinsi S (1985) Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal γ -aminobutyric acid in vivo. *J Neurochem* 45: 879–889
- Lovinger DM (1991) Trans-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (t-ACPD) decreases synaptic excitation in rat striatal slices through a presynaptic action. *Neurosci Lett* 129: 17–21
- Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275
- Meller E, Goldstein M, Bohmaker K (1990) Receptor reserve for 5-hydroxytryptamine 1_A-mediated inhibition of serotonin synthesis: possible relationship to anxiolytic properties of 5-hydroxytryptamine 1_A agonists. *Mol Pharmacol* 37: 231–237
- Mercuri NB, Saiardi A, Bonci A, Picetti R, Calabresi P, Bernardi G, Borrelli E (1997) Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D-2 receptor deficient mice. *Neuroscience* 79: 323–327
- Mitchell PR, Martin IL (1978) Is GABA release modulated by presynaptic receptors? *Nature* 274: 904–905
- Nordström O, Bartfai T (1980) Muscarinic autoreceptor regulates acetylcholine release in rat hippocampus: in vitro evidence. *Acta Physiol Scand* 108: 347–353
- O'Hara CM, Uhland-Smith A, O'Malley KL, Todd RD (1996) Inhibition of dopamine synthesis by dopamine D2 and D3 but not D4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 186–192
- Paulsen RE, Odden E, Fonnum F (1988) Importance of glutamine for γ -aminobutyric acid synthesis in rat neostriatum in vivo. *J Neurochem* 51: 1294–1299
- Pérez de la Mora M, Rizo-Silva A, Méndez-Franco J (1992) Is there a high molecular weight glutamic acid decarboxylase? *Neurochem Res* 17: 339–343
- Pérez de la Mora M, Hernandez-Gomez AM, Méndez-Franco J, Fuxe K (1993) Cholecystinin-8 increases K⁺-evoked [³H] γ -aminobutyric acid release in slices from various brain areas. *Eur J Pharmacol* 250: 423–430
- Pérez de la Mora M, Aguilar-García A, Ramon-Frías T, Ramírez-Ramírez R, Méndez-Franco J, Rambert F, Fuxe K (1999) Effects of vigilance promoting drug modafinil on the synthesis of GABA and glutamate in slices of rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 259: 181–185
- Potashner SJ (1979) Baclofen: effects on amino acid release and metabolism in slices of guinea pig cerebral cortex. *J Neurochem* 32: 103–109
- Pothos EN, Przedborski S, Davila V, Schmitz Y, Sulzer D (1998) D₂-like dopamine autoreceptor activation reduces quantal size in PC 12 cells. *J Neurosci* 18: 5575–5585
- Raiteri M, Angeline F, Levi G (1974) A simple apparatus for studying the release of neurotransmitter from synaptosomes. *Eur J Pharmacol* 25: 411–414
- Raiteri M, Bonnano G, Fedele E (1989) Release of γ -[³H]aminobutyric acid (GABA) from electrically stimulated rat cortical slices and its modulation by GABA_B autoreceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 250: 646–653
- Rollema H, Clarke T, Sprouse JS, Schulz DW (1996) Combined administration of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1D} antagonist and 5-HT re-uptake inhibitor synergistically increases 5-HT release in guinea pig hypothalamus. *J Neurochem* 67: 2204–2207

- Romo R, Chéramy A, Godeheu G, Glowinski J (1986) In vivo presynaptic control of dopamine release in the cat caudate nucleus – I. Opposite changes in neuronal activity and release evoked from thalamic motor nuclei. *Neuroscience* 19: 1067–1079
- Schon F, Kelly J (1974) The characterization of [³H]GABA uptake into the satellite glial cells of rat sensory ganglia. *Brain Res* 62: 275–288
- Schousboe A, Westergaard N, Waagepetersen HS, Larsson OM, Bakken IJ, Sonnewald U (1997) Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia* 21: 99–105
- Schaffer RA, Levant B (1998) The D-3 dopamine receptor in cellular and organismal function. *Psychopharmacology* 135: 1–16
- Simmonds MA (1983) Multiple GABA receptors and associated regulatory sites. *Trends Neurosci Lett* 6: 279–281
- Van den Berg CJ, Matheson DF, Nijemantig WC (1977) Compartmentation of amino acids in the brain: the GABA-glutamine-glutamate cycle. In: Fonnum F (ed) *Amino acids as chemical transmitters*. Plenum Press, New York, pp 709–724
- Waldmeier PC, Baumman PA (1990) Presynaptic GABA receptors. *Ann NY Acad Sci* 604: 136–151
- Waldmeier PC, Stöckling K, Feldtrauer J-J, (1992) Systemic administration of baclofen and the GABA_B antagonist, CGP 35348, does not affect GABA, glutamate or aspartate in microdialysates of the striatum of conscious rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345: 548–552
- Waldmeier PC, Hertz Ch, Wicki P, Grunenwald Ch, Baumann PA (1993) Autoreceptor-mediated regulation of GABA release: role of uptake inhibition and effects of novel GABA_B antagonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 347: 514–520
- Waldmeier PC, Wicki P, Feldtrauer J-J, Mickel SJ, Bittiger H, Baumann PA (1994) GABA and glutamate release affected by GABA_B receptor antagonists with similar potency: no evidence for pharmacologically different presynaptic receptor. *Br J Pharmacol* 113: 1515–1521
- Westernik BHC, De Boer P, Timmerman W, De Vries JB (1990) In vivo evidence for the existence of autoreceptors on dopaminergic, serotonergic and cholinergic neurons in the brain. *Ann NY Acad Sci* 604: 492–504
- Whetzel SZ, Shih YH, Georgic LM, Akunne HC, Pugsley TA (1997) Effects of dopamine D-3 antagonist PD58491 and its interaction with the dopamine D-3 agonist PD128907 on brain dopamine synthesis in rat. *J Neurochem* 69: 2363–2368
- Wolf ME, Roth RH (1990) Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Ann NY Acad Sci* 604: 323–343

Authors' address: Dr. Miguel Pérez de la Mora, Department of Biophysics, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box 70-253, 04510, México D.F., México, Fax +525 622-56-07, E-mail: mperez@ifisiol.unam.mx

Received August 31, 1999