



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**Cuantificación de la Descarboxilasa del Acido Glutámico
en Diversas Estructuras de los Ganglios Basales Sub-
secuente a la Destrucción de las Células Dopaminérgicas
de la Substantía Nigra**



Escuela de Posgrado en Ciencias Químicas

T E S I S

Que para obtener el título de:

Q U I M I C O

P r e s e n t a :

JOSE VICTOR SEGOVIA VILA

México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

I N D I C E

Introducción	1
Capítulo I. Introducción General	
a) GABA como neurotransmisor	4
b) Metabolismo y enzimas clave	8
c) Anatomía	19
d) Función del GABA en los ganglios basales	23
Capítulo II. Trabajo Experimental	
a) Antecedentes	31
b) Procedimiento	33
c) Métodos	33
d) Análisis del Trabajo Experimental	39
e) Resultados	41
Capítulo III. Discusión	44
Bibliografía	49

CAPITULO I

INTRODUCCION GENERAL

INTRODUCCION.

El estudio de los ganglios basales es, hoy en día, uno de los temas de mayor interés en Neurobiología. Desde hace bastante tiempo se conoce su relación con la actividad motora, descubrimiento originado al observar la relación entre anomalías en estas estructuras y enfermedades motoras como la de Parkinson y la corea de Huntington. Actualmente se relaciona a los ganglios basales, no sólo con funciones motoras, sino con funciones cognoscitivas, lo cual acrecenta aún más la importancia de la investigación sobre estas estructuras y sus relaciones con el conjunto del Sistema Nervioso.

La confluencia de diversas disciplinas en la investigación de los ganglios basales ha proporcionado una visión integradora bastante completa. La Bioquímica ha informado sobre la gran variedad de neurotransmisores y la complejidad de sus relaciones dentro del sistema. La Anatomía, apoyada en las técnicas más modernas, ha permitido que se conozcan cuales son las conexiones nerviosas de los ganglios basales entre sí y con las demás estructuras cerebrales. El trabajo en Neurofisiología ha establecido cuales son los circuitos neuronales funcionales. Por último, los estudios conductuales han permitido discernir cual es el efecto observable de la acción de este sistema como un todo y la participación de las estructuras individualmente. Gracias a experimentos y manipulaciones farmacológicas es posible alterar la transmisión nerviosa, y el uso de ciertas sustancias y drogas permite elaborar modelos conductuales y de enfermedades que aportan información muy valiosa. A lo largo de este trabajo se discutirá cómo, empleando estas técnicas, se han formulado teorías e hipótesis de trabajo sobre la función motora de los ganglios basales.

De la conjunción del trabajo bioquímico y fisiológico se ha podido establecer la presencia del ácido gama amino butírico (GABA) en los ganglios basales, así como de las vías nerviosas que lo emplean. Se cree que el GABA es el mediador en las conductas dependientes de dopamina en el cuerpo estriado. Es decir, se piensa que el GABA es el neurotransmisor que conduce la información que recibe el estriado, proveniente de las células dopaminérgicas de la substantia nigra compacta, hacia el globo pálido, el núcleo entopeduncular, la substantia nigra reticulada y hacia los núcleos ventromedial y parafascicular del tálamo. Se ha comprobado que las vías del cuerpo estriado al pálido, al entopeduncular y a la substantia nigra, al igual que la que surge de la substantia nigra hacia el ventromedial y el parafascicular son GABAérgicas. Por lo tanto, se propone una cadena funcional entre estas estructuras que es mediada por el GABA.

El objetivo de este trabajo es aportar un parámetro bioquímico que ayude a demostrar esta relación. Para lograrlo, se alterará la transmisión GABAérgica y se observarán los efectos que se producen en las estructuras unidas por el GABA, para comprobar un efecto en cascada.

Con tal fin, se impedirá la llegada de la dopamina al estriado, por la destrucción de las células dopaminérgicas de la substantia nigra, y se medirá la actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD), enzima limitante en la síntesis del GABA. Se cuantificará la actividad de la GAD en el cuerpo estriado, el globo pálido, el núcleo entopeduncular, la substantia nigra y los núcleos ventromedial y parafascicular del tálamo.

En este trabajo se presenta, en el primer capítulo, una Introducción General en la cual se demuestra la función del GABA como neurotransmisor, se estudia su metabolismo y las características de las principales enzimas de este proceso. Se presenta la anatomía de los ganglios basales y se

discute la función del GABA en estos núcleos y su relación con la conducta motora. En el segundo capítulo de la tesis se explica detalladamente cual fue la estrategia utilizada para estudiar el problema y se describe el trabajo experimental realizado. En ese mismo capítulo se presentan los resultados y se hace un análisis crítico del método de trabajo y su realización. Por último, en el tercer capítulo, se discuten los resultados y se presentan las conclusiones.

Los estudios aquí realizados arrojan dos sugerencias sobre la organización de los ganglios basales:

- 1) La importancia del relevo del núcleo entopeduncular hacia la substantia nigra, proveniente del globo pálido y

- 2) Un mecanismo regulador diferente en la eferente estriado-nigral que en la estriado-palidal.

Sería difícil exagerar la importancia de la investigación sobre los ganglios basales, tanto en el campo aplicado de la Salud, en el estudio de las enfermedades motoras, como en relación al estudio de las funciones superiores del cerebro, por lo que nos parece un área potencialmente aún muy fructífera, para desarrollar sobre todo, como lo intenta este trabajo, en cuanto a la organización de las conexiones nerviosas.

GABA COMO NEUROTRANSMISOR

NEUROTRANSMISORES.

Un neurotransmisor se define, en términos generales, como una sustancia liberada sinápticamente por una neurona y que afecta de una manera específica a otra célula (ya sea otra neurona, o bien un órgano blanco). Con esto queremos decir que es la forma en que el Sistema Nervioso transmite la información que le es necesaria tanto para percibir como para lograr articular una respuesta.

Generalmente se considera que los neurotransmisores pueden tener dos efectos, el de excitador y el de inhibidor. Estos efectos se traducen, en el excitador, como una disminución en el potencial de membrana, y en el inhibidor, por una hiperpolarización de la célula, es decir, por un aumento en su potencial de membrana.

Los requisitos clásicos que debe tener una sustancia para ser considerada como neurotransmisor son los siguientes:

1. Que se sintetice en la neurona.
2. Estar presente en la terminal y que se libere en cantidad suficiente a la neurona post-sináptica o al órgano efector.
3. Al aplicarse exógenamente en concentraciones razonables debe imitar exactamente el efecto que tiene el transmisor liberado endógenamente.
4. La existencia de algún mecanismo que remueva el transmisor de su sitio de acción (.62, 73,43).

GABA.

La presencia del ácido gama amino butírico (GABA) en tejido neuronal fue descubierta, en forma independiente, por Eugene Roberts y Jorge Awapara en 1950. Ambos investigadores

se encontraban trabajando en proyectos relacionados con cáncer. Trataban de estudiar el contenido de aminoácidos de tumores, especialmente de neuroblastomas. Trabajando con este material y usando la técnica de cromatografía en papel, encontraron una sustancia que posteriormente fue caracterizada como GABA (4,61).

Los requisitos que debe tener un neurotransmisor han sido cumplidos por el GABA, tanto en mamíferos como en crustáceos. A continuación presentaremos dos preparaciones, apoyadas en su evidencia experimental, que comprueban el papel de GABA como neurotransmisor.

En la preparación de músculo de langosta se ha comprobado que:

1. La aplicación externa de GABA imita el efecto de un impulso inhibitorio.
2. La aplicación de GABA, sea exógena o endógena, hace que la membrana post-sináptica sea más permeable al anión Cl^- . Esta acción puede ser eliminada tanto por la picrotoxina como por la bicuculina que son aceptadas como antagonistas a GABA, o sea, que tienen un efecto contrario.
3. Las células y axones inhibitorios de langosta tienen una mayor concentración de GABA que las excitadoras.
4. El sistema enzimático necesario para la síntesis y la destrucción de GABA se encuentra en las neuronas y axones inhibitorios.
5. Se ha descrito un sistema específico de retoma de GABA en langosta y acocil. Este mecanismo es dependiente de sodio.
6. Debido a la estimulación de axones inhibitorios, se ha comprobado la liberación de GABA en la preparación nervo-muscular de langosta (18).

El ejemplo clásico para demostrar la función de GABA

como neurotransmisor en mamíferos, se tiene en el caso de las células de Purkinje

1. La estimulación de las células de Purkinje provoca una hiperpolarización en los núcleos cerebelosos profundos y en las células de Dieters.

2. La membrana post-sináptica es permeable al cloruro y otros aniones durante la despolarización.

3. Los antagonistas clásicos de GABA, bicuculina y picrotoxina, bloquean los efectos de la excitación, pero la estricnina, que no es antagonista GABA-érgico, no lo logra.

4. La concentración de GABA en los núcleos de Dieters es mucho mayor en la parte dorsal, es decir, en la zona que recibe las terminales nerviosas de las células de Purkinje.

5. Al aplicar iontoforéticamente GABA en las células de Dieters se tiene una réplica del efecto que se observa con la estimulación de las células de Purkinje. La desaparición de este fenómeno se puede obtener aplicando picrotoxina o bicuculina, pero no con estricnina.

6. Si se hace una lesión de la corteza cerebelosa, o se cortan los axones que provienen de las células de Purkinje, se ve un decremento de GABA y GAD en la porción dorsal de los núcleos de Dieters, pero la concentración de la región ventral no varía.

7. Al estimular las células de Purkinje se libera una cantidad detectable de GABA en el fluido de perfusión del cuarto ventrículo, o bien, del obtenido con una cánula push-pull colocada en los núcleos cerebelosos.

8. Las técnicas inmunohistoquímicas demuestran la presencia de GAD (la enzima limitante en la síntesis de GABA) en las terminales de las células de Purkinje (49).

Los resultados provenientes de estos estudios demuestran el papel de GABA como neurotransmisor en un amplio espectro de desarrollo filogenético. No son éstas las únicas preparaciones que demuestran la función de GABA, pero consideramos que con estos ejemplos queda bien determinado su pa-

pel como transmisor.

Ya se ha comentado que GABA se encuentra distribuido en todo el cerebro; su concentración promedio en el humano es de más de 10 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de tejido (18), lo que nos da una concentración de 200 a 1000 veces mayor que el de cualquier otro neurotransmisor en el cerebro (67). Se piensa, con base en estudios de retoma de GABA marcado, que de un 25 a 45% de todas las terminales nerviosas cerebrales poseen GABA, lo cual no es de extrañar si consideramos que GABA sirve como transmisor inhibitor en una gran cantidad de interneuronas (49).

La tabla número 1 indica las principales vías del Sistema Nervioso que emplean este transmisor y cuales son las evidencias experimentales que los apoyan.

Existen estudios que demuestran que en rebanadas de cerebro se libera GABA, ya sea debido a la estimulación eléctrica o a la presencia de una alta concentración de potasio en el medio de incubación; también con rebanadas y usando GABA marcado se ha podido comprobar la existencia de un sistema específico de retoma (56, 43).

A partir de los estudios exhaustivos que se han realizado sobre la distribución de GABA y GAD en mamíferos (15), podemos concluir que este neurotransmisor se encuentra ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central, en especial en la Substantia Nigra, el Globo Pálido y el Hipotálamo, que se encuentra como trazas en el sistema periférico y otros órganos, y que existe una buena correlación entre la actividad de la enzima y la cantidad de GABA.

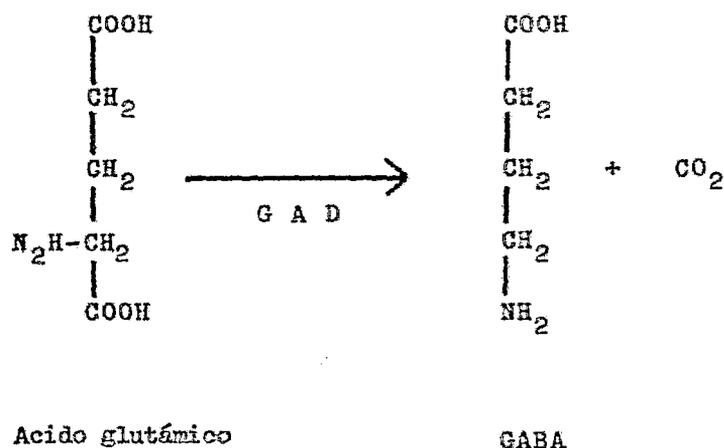
TABLA 1

VIA	EVIDENCIA
Células de Purkinje	Liberación de GABA, acción inhibidora, inmunohistoquímica, lesión, correlación farmacológica, flujo axoplásmico.
Células cerebrales de Golgi	Acción inhibidora, retoma, inmunohistoquímica.
Células cerebrales de canasta	Inmunohistoquímica, retoma, acción inhibidora.
Células cerebrales estrelladas	Acción inhibidora, retoma.
Células hipocampales de canasta	Inmunohistoquímica, acción inhibidora, localización, lesión.
Interneuronas estriatales	Lesión, retoma.
Células estriado-nigrales	Lesión.
Neuronas pálido-nigrales	Lesión, flujo axoplásmico, retoma.
Interneuronas retinianas	Retoma, localización.
Interneuronas espinales	Localización, acción inhibidora, inmunohistoquímica, retoma, acción fisiológica.
Interneuronas corticales	Efecto inhibidor.
Interneuronas del bulbo olfatorio	Acción fisiológica, inmunohistoquímica.

(Tomada de Mc Geer et al., 1980)

METABOLISMO DEL GABA

La principal fuente de GABA en el Sistema Nervioso Central es debida a la descarboxilación del l-glutamato por la l-glutamato l-carboxilasa (E.C.4.1.1.15), comunmente conocida como glutamato descarboxilasa (GAD), que emplea como co-factor el fosfato de piridoxal.



Según el precursor que se emplee y las condiciones del experimento, las cantidades de glutamato marcado y la cantidad de GABA que se sintetiza relativas al tejido pueden ser variables.

Esta evidencia ha dado lugar al empleo del concepto de pozas o de compartamentalización, que es una definición de cinética y no de morfología.

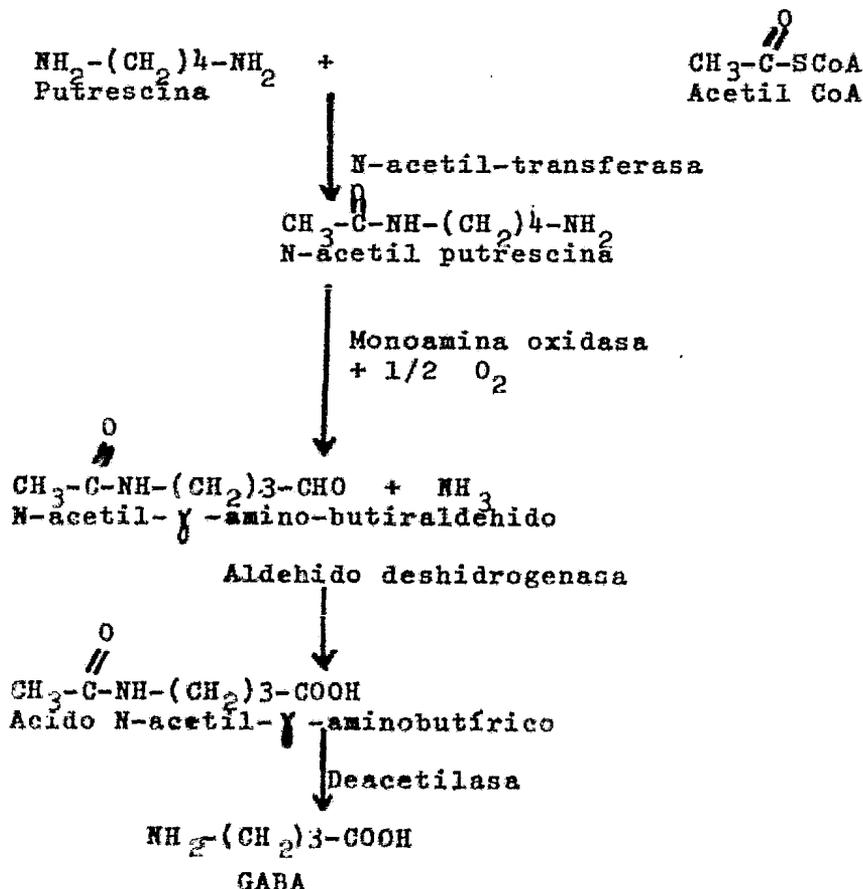
Entre otras vías alternativas o de síntesis de GABA que caben dentro de este concepto de compartamentalización, se encuentra la formación de GABA a partir del γ -hidroxibutirato (GHBA) ($\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$). Se pensó en la existencia

$$\begin{array}{c}
 \text{OH} \\
 | \\
 \text{CH}_2
 \end{array}$$

de esta vía, ya que si el GHBA se forma a partir de GABA, se sugirió que podía existir la reacción inversa. Subsecuentes investigaciones radioisotópicas con (^{14}C) en cerebro de ratón confirmaron que átomos de carbón de GHBA fueron convertidos a GABA.

En cerebro de peces se ha observado que una poliamida, la putrescina (1,4 diaminobutano), es un precursor de GABA. Sin embargo, no se ha podido comprobar si los átomos de putrescina son o no metabolizados a través de pequeños, aún no bien identificados, compartimientos de la poza de glutamato en cerebro de trucha.

En ratón también se ha comprobado la existencia de una vía metabólica para la biosíntesis de GABA a partir de putrescina(5,71).



Si bien se ha comprobado que algo de putrescina llega a GABA, se ha observado que la mayor parte va a homocarnosina, al igual que llega desde GABA propiamente dicho.

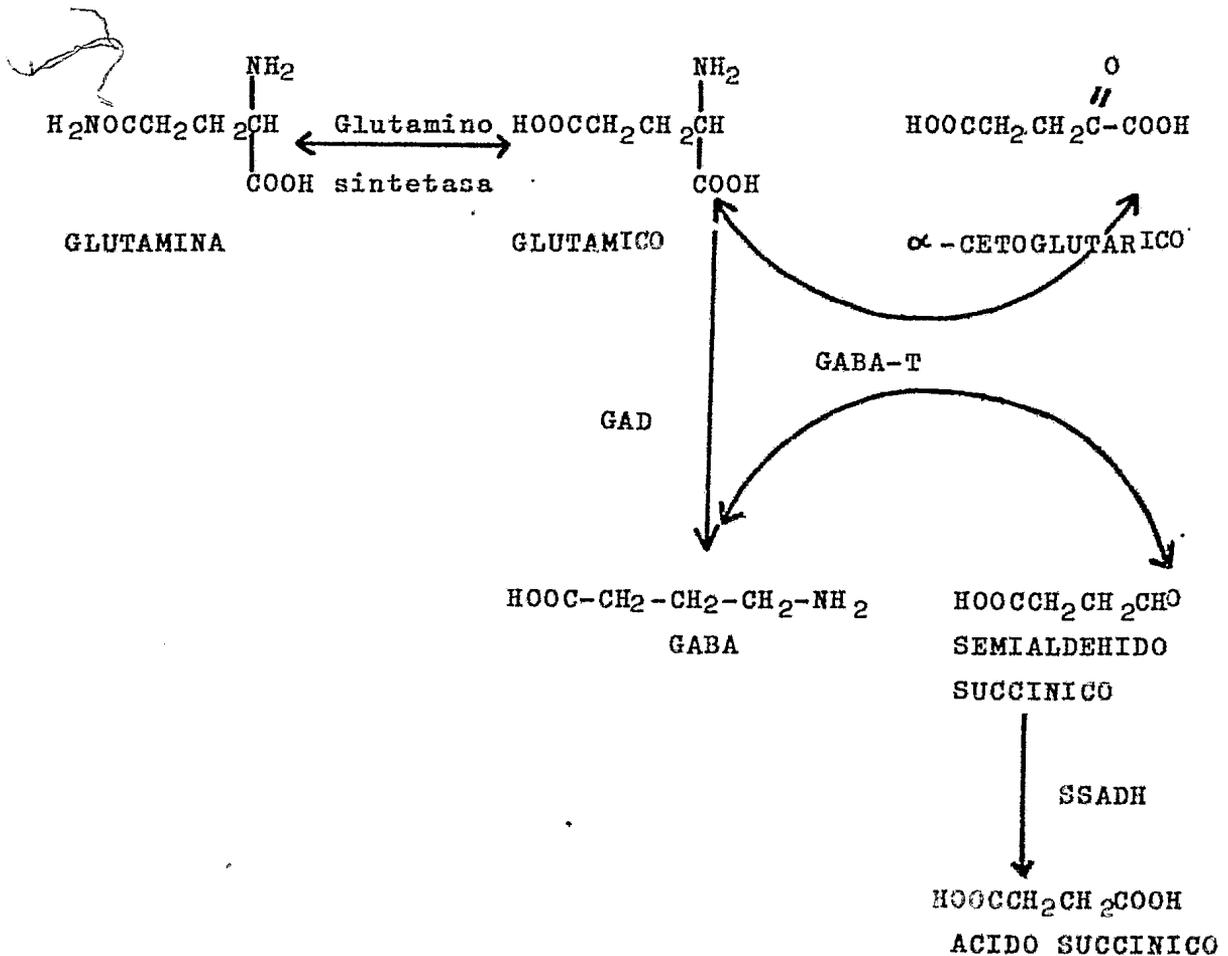
Por tanto es posible afirmar que en el cerebro la descarboxilación del l-glutamato es la mayor y más importante vía de síntesis de GABA. De aquí se concluye, como indica una gran cantidad de literatura (26, 18, 49, 7, 5, 74), que la medida de la actividad de GAD sea una buena indicación de la cantidad de GABA presente en una estructura dada.

Parte importante en el catabolismo del GABA sucede debido a un corto-circuito metabólico. Para su destrucción, el GABA es transaminado por la GABA-oxo-glutarato transaminasa (GABA-T; 2 oxoglutarato aminotransferasa; EC 2.6.1.19) para formar aldehído succínico. Esta transaminación sólo se lleva a cabo si el α -cetoglutarato (α -oxoglutarato) es el aceptor del grupo amino. De esta manera se convierte el α -cetoglutarato en glutamato, el cual es el precursor de GABA, garantizando así la continuidad del suplemento. Así, una molécula de GABA sólo puede destruirse metabólicamente si, al mismo tiempo, se forma una de su precursor inmediato. El semialdehísuccínico formado a partir del GABA es rápidamente oxidado por la deshidrogenasa del semialdehído succínico (SSADH; EC.1.2.1.24; NAD oxidoreductasa del semialdehído succínico) que nos da ácido succínico que puede entrar al ciclo de Krebs (67).

El corto circuito metabólico es, desde el punto de vista energético, menos eficiente que la porción del ciclo del ácido tricarbóxico que va desde el α -cetoglutarato hasta el ácido succínico, ya que solo proporciona 3 moléculas de ATP, contra 3 de ATP y una de GTP.

Se puede saber, por medio de estudios empleando radioisótopos, que la glucosa es probablemente la mayor fuente de GABA in vivo. Varios aminoácidos y el piruvato también pueden servir, entrando al ciclo de Krebs. Así, hasta los más remotos precursores pueden ser convertidos a GABA a través de la vía del α -cetoglutarato a glutamato o glutamina que, en conjunto

forman más del 60% del nitrógeno de α -aminoácidos libres en el cerebro, siendo factible que su función sea la de ser un reservorio para GABA (49). Así por ejemplo se ha comprobado que del 8 al 10 % de los carbonos que entran al ciclo de Krebs llegan a GABA, lo que ha dado lugar a que algunos autores hablen de un flujo de GABA metabólico y otro de transmisor (67,49).



Ya se ha demostrado que la medida de la actividad de GAD es un buen indicador de la cantidad de GABA presente. Al analizar esta vía metabólica se encuentra una razón más para emplearla como nuestro parámetro. Al sobrevenir la muerte, la cantidad de cetoglutarato disminuye rápidamente, por lo que GABA no puede ser destruido, pero aún puede ser sintetizado a

partir del glutamato, y a esto se debe el gran aumento de GABA post-mortem, por lo que el nivel del transmisor puede aumentar hasta un 500% en los dos minutos inmediatos a la muerte (1, 46).

ENZIMAS CLAVE DEL METABOLISMO DEL GABA

G A D

La enzima responsable de la descarboxilación del glutamato, la glutamato descarboxilasa (l-glutamato 4-carboxilasa E.C. 4.1.1.15), se encuentra ampliamente distribuida en los seres vivos; filogenéticamente aparece en bacterias y hongos hasta llegar a los mamíferos más desarrollados.

La enzima cerebral es muy similar en los mamíferos, pero la de peces, pájaros y anfibios son diferentes a la de ratón, que fue la primera en ser purificada y es la mejor estudiada (31, 72).

Al realizar el fraccionamiento subcelular del tejido nervioso se encuentra que el 40% de GAD se encuentra asociada a sinaptosomas. Una cantidad similar se localiza en el citoplasma y una cantidad menor en mitocondrias (72). Otros estudios, sin embargo, indican que la mayor cantidad de la enzima se encuentra en terminales presinápticas (7, 30).

GAD ha sido obtenida como una proteína homogénea y estable de cerebro de ratón. De la enzima purificada se han obtenido anticuerpos y así se ha logrado realizar estudios inmunoquímicos e inmunohistológicos (72). Se acepta generalmente que en las terminales sinápticas GAD se encuentra en forma soluble y unido, como lo prueba la localización inmunocitoquímica, a las membranas de las vesículas sinápticas (7).

El peso molecular de GAD (ratón) se determinó a partir de ν , como de 85 000d y por filtración en Gel se obtuvo el peso de 86 000. Al ultracentrifugar GAD y tratarla con guanidina-HCl

y β -mercaptoetanol .1M se disoció en dos subunidades indistinguibles con un peso molecular aproximado de 44 000 cada una. Posteriores estudios electroforéticos muestran bandas con un peso molecular de 15 000, por lo que se ha sugerido que realmente sean 6 subunidades mínimas organizadas en dos subunidades mayores (81).

Algunos investigadores han reportado en GAD humana y de rata (7) un peso molecular de 140 000. Sin embargo, ya que los datos inmunoquímicos señalan la similitud de las enzimas, se ha achacado esta diferencia a fuentes metodológicas (72).

Especificidad por el sustrato.

Mediante ensayos radioisotópicos se han probado los 20 aminoácidos que se encuentran naturalmente, al igual que el α -cetoglutarato, como posibles sustratos para GAD. De todos los que se probaron, tan solo el L-(U- ^{14}C)



(ácido aspártico) mostró una actividad de aproximadamente el 3% comparada con la del ácido glutámico solo. La evidencia de que el ácido aspártico sí fue verdaderamente descarboxilado provino por la identificación del producto como α -alanina. También se calculó, por radioactividad, la relación del CO_2 formado con respecto a la alanina encontrada y ésta fue de 1:1 (81). Por tanto la actividad de sustrato observada con el ácido aspártico marcado debe atribuirse a la descarboxilación de este ácido y no a contaminación debida al ácido glutámico.

Valores de K_m .

Los valores de K_m de GAD para el ácido glutámico, sustrato, y para el fosfato de piridoxal (PLP), su co-enzima, fueron obtenidos de una gráfica de Lineaweaver-Burk y fueron .7 mM y .05 mM respectivamente, en ratón (67, 81).

La inhibición competitiva realizada por reactivos con sulfihidrido como DTNB (Acido ditiobis-(2nitrobenzoico) y PCMB (paracloro mercuribenzoato) sugieren la participación de un grupo sulfihidrido en o cerca del sitio activo. La inhibición por DTNB es independiente de la concentración de fosfato de piridoxal. La iodoacetamida inhibió de 59 a 85% con concentraciones de

.16 hasta 1.6 mM; el ácido iodoacético, bajo las mismas condiciones inhibió del 10 al 60%.

Compuestos con grupo tiol. Se ha reportado que el ácido 3-Mercaptopropiónico inhibe a GAD en homogenados cerebrales y que provoca convulsiones al ser inyectado intraperitonealmente en ratas. A una concentración 10mM da una inhibición de 65%. Los ácidos 2-mercaptopropiónico y 2-mercaptoacético fueron menos eficaces.

La inhibición producida por estos compuestos fue de tipo competitivo con respecto al glutamato. Sus K_{is} fueron, respectivamente, de 1.8,53 y 330 mM (81).

El GAD es inhibido por cationes divalentes como $Zn^{2+} > Cd^{2+} > Hg^{2+} > Cu^{2+}$, que fueron agregados como acetatos en solución amortiguadora de fosfatos (81).

La enzima es muy sensible a la inhibición provocada por agentes atrapadores de carbonilo. De estos, el más eficaz es el ácido aminooxoacético*, con una inhibición de 97% a una concentración de 1.6 mM y de 33% a una concentración de .1mM. En orden descendente como inhibidores siguen: hidroxilamina, hidrazina, penicilamina y semicarbazida (81).

Efecto de aminoácidos y compuestos relacionados.

Los aminoácidos como el D-glutamato, D-L-hidroxiglutamato y D-L- α metilglutamato, demostraron ser inhibidores competitivos para GAD; sus K_{is} fueron de .9, 2.8 y 6.2 mM (81).

Efecto de ácidos mono y dicarboxílicos.

La inhibición de GAD por estas moléculas fue usada para determinar la distancia óptima entre los dos grupos carboxílicos envueltos en la unión de los compuestos y la enzima. El ácido glutárico fue, entre los dicarboxílicos, el más eficiente ($K_i = 3.5$ mM); la inhibición se reduce al aumentar o disminuir la cadena de carbonos. los ácidos α -cetoglutárico, fumárico y oxaloacético también actuaron como inhibidores competitivos (81).

* AOA

Efecto de algunos metabolitos.

Los intermediarios glucolíticos causaron ligera inhibición aún a altas concentraciones. De los intermediarios del ciclo de Krebs ninguno produjo inhibición a concentraciones de 5mM (81).

Aniones monovalentes.

Se comprobó que eran inhibidores débiles; el más potente fue el SCN^- con 55 y 28% de inhibición a concentraciones de 10 y 1 mM. El orden, descendente, de eficiencia inhibidora para aniones monovalentes es el siguiente: $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ (81).

La inhibición producida por el cloruro es de interés, ya que el efecto inhibidor de GABA es debido a un aumento en la permeabilidad de la membrana para este anión. La inhibición debida al Cl^- es de carácter competitivo y tiene una $K_i = 17\text{mM}$ (81).

Estudios de pH. han indicado que el pH. óptimo para GAD se encuentra cerca de 6.5 (18, 81).

Se ha descubierto actividad de GAD en tejido no neuronal como riñón, corazón, hígado, vasos sanguíneos y glía. De esta actividad se ha responsabilizado a una enzima que se conoce como GAD II (35). Entre las diferencias existentes entre estas enzimas se encuentra que GAD II es estimulada por agentes atrapadores del carbonilo como AOA y aniones como Cl^- , mientras que GAD I, o neuronal, es inhibida por estos factores (35,18). Existen, por otra parte, reportes de que su cinética es también diferente (35,74).

Regulación Fisiológica de GAD

La actividad de GAD se encuentra regulada por bio-retroalimentación y mecanismos inductores. Así, un aumento en la concentración de GABA nos dará una disminución en la actividad de GAD I (72). Si, por ejemplo, se inyecta AOA que hace que aumente el GABA endógeno por la estimulación de GAD II, ambas enzimas disminuyen (72).

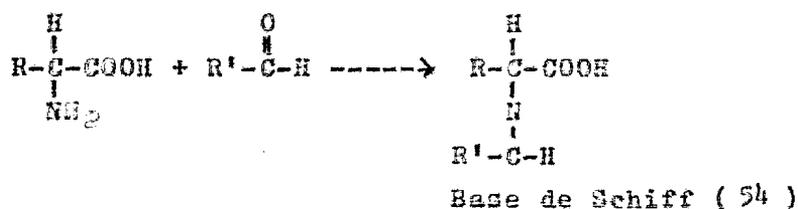
El Zn^{2+} inhibe a GAD. PLP es el cofactor de GAD y requiere de Zn^{2+} para ser sintetizada a partir del piridoxal por la fosfoquinasa de piridoxal que requiere del zinc; por lo tanto el efecto de este metal sobre la actividad de GAD es doble(5).

GAD cerebral puede ser inducida, se han reportado aumentos en la actividad de GAD al aplicar glutamato y también que la acetilcolina tiene efecto sobre GAD en la corteza cerebelosa de ratón (72).

Como veremos más tarde, GAD puede ser inducido por actividad transináptica como en el caso de la dopamina en estriado y substantia nigra (33).

Hasta el momento no se conoce el mecanismo de acción de GAD, por lo que lo único que se puede presentar es una extrapolación sobre el mecanismo de otras descarboxilasas. En varias de estas enzimas el PLP se encuentra unido débilmente a un residuo lisil. El mecanismo general, se supone, implica un ataque electrofílico del nitrógeno α -amino del aminoácido sustrato, desplazando la unión entre la enzima y el PLP formando una base de Schiff. Después de la descarboxilación y liberación del producto se vuelve a establecer la unión entre la enzima y el PLP (72).

Formación de una base de Schiff.



GABA - Transaminasa (GABA-T)

Esta enzima (oficialmente conocida como α oxoglutarato aminotransferasa: EC2.6.1.19) se encuentra ampliamente distribuida

buída en todo el cuerpo y así, aunque el GABA casi no se forme fuera del Sistema Nervioso Central, el de origen exógeno puede ser destruído fácilmente.

La Tabla No 2 nos brinda una buena comparación entre los datos obtenidos para GABA-T en humano y en rata.

Se indica que la Km de GABA-T para α -cetoglutarato es de .25 mM y para GABA de 1.1 mM (81). La relación de GABA-T/GAD, en cerebro, es casi siempre mayor que 1 (18).

Los agentes con grupo sulfihidrilo tienden a disminuir la actividad de la enzima, de aquí que se haya sugerido uno o más de estos grupos intactos para su correcto funcionamiento. GABA-T se encuentra asociada a la fracción mitocondrial. Se ha dicho que las mitocondrias liberadas de sinaptosomas tienen una acción de GABA-T menor que la fracción mitocondrial cruda. De estos datos se ha inferido que las mitocondrias de las terminales nerviosas tienen una menor actividad de GABA-T y que, por lo tanto, gran parte del GABA se metaboliza extraneuronamente, ya sea en postsinapsis o en glia (18).

Así como se ha visto que la actividad de GAD está bien relacionada con la concentración de GABA, es decir, alta actividad de GAD (en substantia nigra, por ejemplo) en una región implica gran concentración de GABA, la actividad de GABA-T no se puede relacionar de manera directa con la cantidad de GABA. Así, si tomamos la substantia nigra, la estructura con mayor cantidad de GABA, veremos una baja actividad de transaminasa. Sin embargo, la relación no es totalmente inversa ya que en otras regiones (colículo inferior, núcleo dentatus) con alta concentración de GABA, la actividad de la enzima es bastante alta (26).

Deshidrogenasa del Semialdehído Succínico (SSADH)

Esta enzima (también llamada NAD oxidoreductasa del semialdehído succínico: E.C.1.2.1.24) posee una gran especificidad por el sustrato, gracias a lo cual no es difícil de distinguir de la aldehído deshidrogenasa, que también se en-

cuenta en muchas regiones cerebrales.

Se ha reportado una Km de 4.7×10^{-6} M y 9.9×10^{-5} M para el semialdehído succínico y el NAD (cofactor), respectivamente, en cerebro de rata (14). Para humano y mono, las constantes son de 2.7×10^{-6} M y 5.3×10^{-6} M, en el mismo orden (14). En humanos su pH. óptimo se reporta como de 9.2 (18). En rata, se ha encontrado un peso molecular de 140 000 y que se encuentra formada por dos subunidades idénticas (14). Es una enzima mitocondrial y su distribución, en cerebro, es similar a la de GABA-T, que es la enzima que le proporciona el sustrato (18). Al contrario que GABA, la concentración de la enzima parece ser muy baja, del orden de .05 a .1 nM/g de cerebro de ratón (14). Aún así su actividad es muy alta, si vemos su relación con GABA; en humano es de 1.5 y en rata varía de 1.8 a 5. La mayor actividad de la enzima ha sido reportada en hipotálamo y ganglios basales (14), lo que es congruente con los informes sobre actividad de GAD y concentración de GABA.

TABLA No 2

PARAMETRO	GABA-T (rata)	GABA-T (humano)
Peso molecular	105 000+- 5 000	109 000+- 5 000
Subunidades	Dimero	Dimero
Peso molecular de subunidades	57 000+- 5 000	57 000+- 5 000
Puentes disulfuro	No	No
pH. óptimo	8.5-8.6	8.5
Termoestabilidad	Desnaturalización rápida a 55 C	Desnaturalización lenta a 55 C

(Tomado de Maftre et al., 1978)

ANATOMIA

A través del desarrollo histórico de la neuroanatomía ha variado la designación de las estructuras que son o pertenecen a los ganglios basales. Aún ahora hay autores que incluyen núcleos no considerados por otros investigadores.

Sin embargo, podemos concluir que tres grandes núcleos subcorticales siempre han sido considerados como ganglios basales y nosotros los tomaremos así: el núcleo caudado, el putamen y el globo pálido forman los ganglios basales y, considerando a las diferentes estructuras talámicas, subtalámicas y mesencefálicas, constituyen el que ha sido conocido durante mucho tiempo como sistema motor extrapiramidal (Fig.1).

El cuerpo estriado se compone, en el humano, del núcleo caudado y del putamen. En la rata se encuentra como una sola estructura, llamada cuerpo estriado.

El núcleo caudado es una masa celular gris alargada y en forma de arco relacionada en toda su estructura con el ventrículo lateral. La cabeza del núcleo se encuentra rostral al tálamo y emerge en él hasta el ventrículo; el cuerpo es una delgada masa celular dorsolateral al tálamo; la cola, por último, es caudal al tálamo y entra al lóbulo temporal donde termina relacionándose con el complejo amigdalino (12).

El putamen es la parte más grande y lateral del cuerpo estriado; se localiza entre la cápsula externa y la lateral a la lámina medular del globo pálido. Se encuentra medial a la corteza insular, separada de ésta por la cápsula externa y el claustrum; rostral y ventralmente el putamen y la cabeza del caudado son continuos, ya que en esa parte no hay fibras de la cápsula interna (12).

El globo pálido se encuentra acomodado medialmente al putamen en casi toda su extensión; el borde ventral se encuentra adyacente a la substantia innominata y a los núcleos olfatorios basales. Una lámina medular separa al pallidum en seg-

mentos medial y lateral; otra lámina, no tan precisa, divide al medial en porciones interna y externa (9).

El núcleo entopeduncular sigue al segmento palidal lateral de forma rostro lateral y así adquiere una posición medial, por lo que en ocasiones, se le llama segmento palidal medial (9).

El globo pálido es filogenéticamente anterior al cuerpo estriado, por lo que también se le conoce como palios-triatum; y al cuerpo estriado se le da también el nombre de neostriatum. El caudado-putamen se encuentra en el telencéfalo, mientras que el globo pálido es una estructura diencefálica.

Por la parte caudal al globo pálido se encuentra la substantia nigra, que es la estructura más grande y que se encuentra dorsal al crus cerebri y se extiende a todo lo largo del mesencéfalo. Para propósitos descriptivos, generalmente se divide en dos partes: a) la parte compacta que es una zona muy rica en células y que, en humanos, se compone de neuronas grandes y muy pigmentadas y b) la parte reticulada con menor cantidad de neuronas (12).

El núcleo sub-talámico o cuerpo de Luys es una pequeña estructura en forma de lente u ovoide situado a lo largo de la superficie dorsomedial de la parte peduncular de la cápsula interna, es decir, en la parte basal del diencefalo, justo en la transición al mesencéfalo (12).

Macroscópicamente el cuerpo estriado es cruzado por una gran cantidad de fibras delgadas y poco mielinizadas -condición a la cual debe su nombre de estriado. Estas fibras forman los lápices de Wilson que convergen radialmente sobre el globo pálido y pasan a través de éste para así innervar al núcleo entopeduncular; continuando su recorrido caudalmente pasan a través del pedúnculo cerebral formando la parte ventral del peine de Edinger y, de esta forma, penetran en la substantia nigra (9).

CONEXIONES NERVIOSAS Y SUS NEUROTRANSMISORES

Aferentes estriatales.

Casi todas las áreas corticales envían fibras al cuerpo estriado; estas fibras eferentes corticales forman sinapsis con las espinas dendríticas de las neuronas estriatales. Estudios electrofisiológicos indican que son innervaciones excitatorias, cuyo transmisor es el ácido glutámico (51,50).

Aferentes talamo-estriatales.

Los estudios anatómicos indican que el cuerpo estriado recibe fibras talámicas provenientes del complejo nuclear centro-mediano y parafascicular. La estimulación del área ventrolateral provoca EPSP en el caudado, al igual que el proveniente de las células que se encuentran en la zona intralaminar (41).

Aferentes nigro-estriatales.

Estas vías salen de la zona compacta de la substantia nigra hacia el cuerpo estriado (28); son fibras no mielinizadas, pequeñas, cuyo neurotransmisor es la dopamina (27). Existe, además, evidencia, principalmente de carácter electrofisiológico, que indica que el cuerpo estriado recibe fibras provenientes del mesencéfalo, de hecho, del núcleo dorsal del raphe y que la serotonina es el transmisor usado por esta vía (41).

También ha sido posible localizar otros neurotransmisores dentro del propio cuerpo estriado, que se encuentran en las interneuronas como son las colinérgicas (58,80), GABAérgicas (58,33) y otras sustancias transmisoras cuyas neuronas no se encuentran tan bien caracterizadas como la encefalina, angiotensina y VIP (50,53).

Eferentes estriatales.

Se ha comprobado que las fibras eferentes a globo pálido y a substantia nigra tienen un arreglo topográfico y que esta vía se origina en las neuronas medianas espinales del cuerpo estriado (12).

La estimulación del caudado, en gatos anestesiados, provoca IPSP en la substantia nigra; las eferentes a estas dos estructuras se han caracterizado como GABAérgicas (41,64) (Existe aún discusión de si la eferente a globo pálido es una vía o, solamente, una colateral de la vía estriado-nigral). Del estriado surge otra eferente a substantia nigra que contiene substancia P y que es excitatoria (68,10). La vía estriado-peduncular ha sido caracterizada como GABAérgica (63), al igual que la vía del entopeduncular a la nigra (13).

Podemos observar, por tanto, que las vías que permiten la expresión de las conductas provocadas por la estimulación dopaminérgica, es decir, las que comunican a los ganglios basales con otras estructuras, son las que se originan en el pálido y, principalmente, en la substantia nigra.

Experimentos electrofisiológicos han probado que las proyecciones nigrotalámicas son monosinápticas e inhibitorias (41,28); también se ha comprobado que GABA es el transmisor, ya que el efecto se ha bloqueado con antagonistas GABAérgicos (70,82) y porque la actividad de GAD en tálamo disminuye en un 33% después de la destrucción de la substantia nigra (70).

La nigra proyecta, por otra parte, hacia el borde tectal (22) y así, neuronas de la zona reticulada se dirigen hacia el colículo superior. El neurotransmisor se ha caracterizado como GABA.

Del globo pálido surgen fibras que se dirigen hacia el tálamo, a los núcleos ventral anterior y ventral posterior, que se describen como GABAérgicos (13); también se conoce una eferente GABAérgica hacia el núcleo subtalámico.

La revisión de la evidencia anatómica nos permite ver que el estriado se encuentra en una posición clave para integrar la información que permita la salida de ciertas conductas motoras, así como para concluir que esta información sale a través de la substantia nigra (66).

FUNCION DEL GABA EN LOS GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales, junto a otras estructuras cerebrales, forman el sistema que se ha conocido como extrapiramidal. Estas estructuras participan junto con el cerebelo, el sistema cortico-espinal y otros sistemas descendentes en el control de los movimientos.

Las primeras evidencias de que los ganglios basales participaban en el control de los movimientos voluntarios provinieron de estudios clínicos que probaron que ciertas enfermedades motoras se encontraban asociadas con lesiones de los ganglios basales, ya que estas estructuras no proyectan directamente a la médula espinal.

Las alteraciones motoras que se observaron relacionadas con daños a estas estructuras, pueden agruparse dentro de tres grupos principales: a) Bradiquinesia, es decir, dificultad para iniciar el movimiento, b) Cambio de tono y c) Movimientos involuntarios, tales como temblores.

De estas enfermedades, dos se pueden relacionar claramente con alteraciones en el metabolismo de GABA y son: la enfermedad de Parkinson y la corea de Huntington.

La llamada enfermedad de Parkinson fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817. Sus principales síntomas son: temblor rítmico en reposo, rigidez y una gran dificultad para iniciar el movimiento. Anatómicamente, en estudios post-mortem, es posible ver una marcada degeneración de la substantia nigra en las personas aquejadas de esta enfermedad (20). Este mal se caracteriza por un marcado descenso en los niveles de dopamina en el cuerpo estriado, debido a la degeneración de la proyección dopaminérgica nigro-estriatal y un notable descenso (50%) de la actividad de GAD en la substantia nigra, globo pálido y cuerpo estriado. Estos efectos

ocurren tanto en la rata como en el humano (38). Es interesante notar que los sujetos tratados con L-DOPA como fármaco para la enfermedad de Parkinson, mostraron un aumento en la actividad de GAD, que es proporcional al tiempo de tratamiento en que se les haya administrado (38).

En 1872 George Huntington dió a conocer las observaciones que él, su padre y su abuelo habían hecho en ciertas familias que vivían en un pueblo en el estado de Nueva York. Este grupo tenía una enfermedad caracterizada por tres síntomas principales: ser hereditario, la presencia de movimientos espasmódicos involuntarios y la aparición de demencia(36). Los estudios realizados en sujetos con esta enfermedad muestran una gran degeneración y pérdida neuronal en el estriado, en el cual, las células más pequeñas, caracterizadas como interneuronas GABAérgicas y colinérgicas son las más afectadas. Se localizan pérdidas celulares en la substantia nigra y, en los casos más graves, se ha reportado pérdida celular en el lóbulo temporal, núcleo subtalámico y núcleo centro-mediano del tálamo(20, 69).

Fue Perry, en 1973, quien por primera vez reportó que había una reducción significativa de los niveles de GABA en el núcleo caudado, putamen, globo pálido, substantia nigra y corteza occipital en personas con esta enfermedad. Desde entonces se ha podido probar que los niveles de GAD (69) disminuyen, al igual que los de la colina-acetil transferasa (69), enzima sintetizadora de la acetilcolina, en el neostriado (69). Se han realizado estudios sobre la cantidad de receptores a estos neurotransmisores que indican claras disminuciones (25). Los datos aportados por diversos grupos de investigadores(69,25) sobre el descenso de GAD en cuerpo estriado, hablan de bajas del 65 hasta del 85% y del 56% para la colina acetil transferasa (CAT). Así mismo se reporta una disminución de 69% de la actividad de GAD en la substantia nigra (69). Se estima que la reducción de la actividad de

GAD en globo pálido puede deberse tanto a la degeneración de las células ahí presentes como a la destrucción de las neuronas GABAérgicas que proyectan desde el neostriado.

Parece que se ha desarrollado un importante cuerpo de evidencia que indica que GABA es el mediador de conductas dependientes de receptores dopaminérgicos en el cuerpo estriado.

Carlsson y Lindquist (1963) sugirieron que el efecto de los neurolépticos en el metabolismo de la dopamina era el que causaba un aumento en la utilización de la dopamina debida al bloqueo de sus receptores. Como en esa época ya se aceptaba la existencia de las conexiones nigro-estriado-nigrales, se impuso la teoría de que existía un mecanismo de retroalimentación negativa cerrado, en el cual la acción de la dopamina en los receptores del estriado activaría la salida de GABA del estriado a la substantia nigra la cual, a su vez, regularía el metabolismo de la dopamina (11). Este modelo tenía evidencia que le favorecía; entre ésta, se encuentra el hecho de que la inyección de GABA en la substantia nigra disminuye la utilización de dopamina y que la aplicación iontoforética de GABA sobre las neuronas dopaminérgicas en nigra inhibe su disparo (80). Sin embargo, se ha encontrado que la destrucción de las fibras estriado-nigrales no afecta la utilización de dopamina en el estriado, ni el incremento de utilización después de la aplicación de haloperidol, antagonista al receptor dopaminérgico (34).

Un modelo que ha sido de gran utilidad en estos estudios es el realizado por Ungerstedt en 1971. En este experimento se destruyeron las células dopaminérgicas del cuerpo estriado, unilateralmente, debido a la inyección estereotáxica de la neurotoxina selectiva a neuronas dopaminérgicas, 6-OH dopamina (6-OHDA); posteriormente se inyectó apomorfina (agonista a la dopamina) y se observó una conducta de giro contralateral al sitio de la lesión, que se atribuyó a la hipersensibiliza-

ción de los receptores dopaminérgicos en el estriado (76,77). La hipersensibilización es debida a un aumento en la cantidad de los receptores, así como a un incremento en su afinidad por el substrato, que es causada por una disminución (29) en la cantidad de dopamina disponible. Esta es una importante evidencia de la existencia de conductas motoras dependientes de dopamina en el estriado, ya que el giro contralateral nos habla de una mayor actividad del lado supersensibilizado.

Así, gracias a estudios anatómicos de las conexiones del cuerpo estriado, se ha proporcionado evidencia de que esta estructura está localizada en una posición clave como una unidad integradora en el sistema de los ganglios basales. El cuerpo estriado podría entonces ser capaz de influenciar y modular funciones de la corteza, el cerebelo y el tálamo. Como ya se ha discutido, recibe una innervación masiva de la corteza, y también se sabe que el cerebelo y el cuerpo estriado tienen importantes proyecciones al tálamo (9), el cual, puede influenciar la elaboración cortical de la actividad motora. La evidencia también indica que GABA es de gran importancia en la expresión conductual relacionada con la estimulación de los receptores dopaminérgicos.

Los experimentos conductuales selectivos han sido una importante herramienta para la elaboración de esta teoría y por lo tanto examinaremos la evidencia experimental que han aportado.

La aplicación bilateral intranigral de bloqueadores GABAérgicos, como picrotoxina y bicuculina, producen un estado catatónico que no se puede revertir por la aplicación de agonistas a la dopamina (23). Se ha comprobado que la inyección unilateral de bloqueadores a GABA, en la substantia nigra, antagoniza la conducta de giro producida por apomorfina cuando esta inyección ha sido ipsilateral a una lesión previa con 6-OHDA (23).

Se sabe que la inyección bilateral de agonistas GABAérgicos en la substantia nigra produce conducta estereotipada y la unilateral produce giro contralateral(64,3). Todos estos efectos son producidos independientemente de la dopamina, apoyando la hipótesis de que en esta cadena el GABA es un paso más allá de los receptores dopaminérgicos. Se ve, por lo tanto, que la función de los receptores dopaminérgicos en el cuerpo estriado podría ser la de activar la vía descendente estriado-nigral. Para apoyar esta hipótesis se ha comprobado que la apomorfina aumenta la utilización de GABA en la substantia nigra y que los antagonistas dopaminérgicos la disminuyen (63).

La inhibición de las neuronas de la substantia nigra a través de GABA puede transferir las funciones dopaminérgicas estriatales a los sistemas de salida que desde allí proyectan, al núcleo ventromedial y al núcleo parafascicular del tálamo.

Otra importante vía de salida de los ganglios basales es la que se origina en el núcleo entopeduncular (EP); al mismo tiempo, la vía estriado entopeduncular se encuentra muy relacionada anatómicamente con la vía estriado nigral y por el hecho de que ambas contienen GABA. Así, en EP, la inyección de muscimol, agonista GABAérgico, induce una conducta casi igual a la producida por la inyección sistémica de agonistas a la dopamina (63). La inyección de este agonista en el núcleo subtalámico tuvo efectos similares a los descritos, lo cual sugiere que los agonistas dopaminérgicos actúan bajo el mismo mecanismo que la inyección local de muscimol. Se podría sugerir entonces que en este caso también se activan los sistemas descendentes de salida del cuerpo estriado que son mediados por GABA, como el estriado-peduncular, el estriado-palidal y el pálido subtalámico.

El papel del núcleo subtalámico (STN) puede tener una gran importancia en la integración del sistema. Este núcleo dirige sus fibras eferentes hacia las salidas del cuerpo estriado, v.b., globo pálido, núcleo entopeduncular y substantia nigra(65).

También se han llevado a cabo experimentos farmacológicos en el globo pálido (GP) que han mostrado su relación con la conducta motora. La inyección de muscimol en este núcleo produce catalepsia que dura hasta dos horas, pero que es revertible por la aplicación de antagonistas a GABA, como la picrotoxina. Este efecto es bifásico y dependiente de la dosis, ya que a dosis mayores de 50 mg de muscimol, en la parte ventral del globo pálido, produce una catalepsia corta (5-10 min) que es seguida por un período en el que la rata muestra una alternancia de estados catalépticos y de excitabilidad (63). La inyección unilateral de muscimol también tiene efectos bifásicos ya que se alternan la asimetría postural ipsilateral con la contralateral (64). La aplicación de muscimol en el cuerpo estriado, en la región cercana al globo pálido, también tiene un efecto cataleptogénico (64).

Si bien la dopamina es el neurotransmisor responsable del inicio de una posible cadena de estructuras, es importante saber cómo ejerce su efecto en el cuerpo estriado. Se ha considerado que las proyecciones nigro-estriatales hacen sinapsis con interneuronas colinérgicas del cuerpo estriado y que éstas son un relevo hacia las neuronas de salida; esta hipótesis se apoya en bases histológicas (80). El hecho de que las drogas anticolinérgicas reduzcan el efecto de los neurolépticos en la utilización de dopamina y que la utilización de acetil-colina sea sensible a los efectos de estas drogas, parece indicar una relación entre las proyecciones dopaminérgicas y las interneuronas colinérgicas (20,34).

Por otra parte también se maneja la hipótesis de que este relevo sea llevado a cabo por interneuronas GABAérgicas, también bien caracterizadas dentro del cuerpo estriado (33). La evidencia que apoya esta idea es también muy amplia; sin embargo, ambas posiciones no son, necesariamente, excluyentes y tal vez sus funciones sean complementarias.

La falta de actividad de los receptores a dopamina en el cuerpo estriado, ya sea por la aplicación de 6-OHDA o por el corte

de las fibras nigro-estriatales, produce un aumento en la actividad de GAD en el cuerpo estriado luego de un período de 8 semanas. En ratas con la misma lesión, si se agrega gama-vinil-GABA (GVG), un inhibidor de la GABA-T, se nota una gran acumulación de GABA en el cuerpo estriado (33). Ambos experimentos prueban que la falta de transmisión dopaminérgica en el cuerpo estriado induce un aumento de GABA en el mismo. De aquí se puede concluir que la inervación GABAérgica en el cuerpo estriado ejerce una acción inhibidora en las interneuronas estriatales que contienen GABA y que, por lo tanto, la interferencia con la transmisión dopaminérgica implica una mayor síntesis y utilización de GABA en el cuerpo estriado.

También se ha observado (33) que un aumento de GABA en el cuerpo estriado implica un descenso en la utilización de GABA, en la substantia nigra, debido a una inyección localizada de GVG. Siempre que se inyectó GVG en el caudado-putamen disminuyó la utilización de GABA en la substantia nigra. Además, al poner bloqueadores a GABA en el cuerpo estriado, la acumulación de este transmisor en la substantia nigra aumentó (33).

Esto puede sugerir que la transmisión GABAérgica en el cuerpo estriado ejerce un control inhibidor en las proyecciones GABAérgicas estriado-nigrales. Se ha observado que si se bloquean los receptores dopaminérgicos con haloperidol hay un aumento en la unión de (3H)GABA en la substantia nigra, pero no en el cuerpo estriado (32).

Otros investigadores (21) han reportado que tratamientos con haloperidol y clebopride inducen hipersensibilidad a los efectos de muscimol intranigral unilateral, lo que confirman las evidencias bioquímicas. Además, los estudios de unión de GABA en la substantia nigra relacionados con la destrucción de neuronas dopaminérgicas muestran que, después de la destrucción de estas células, quedan presentes aproximadamente el 70% de los receptores (33); y esto indica que tan sólo el 30% de estos receptores se encuentran relacionados con la dopamina. La mayoría de la información GABAérgica que

llega a la substantia nigra hace sinapsis con células que mandan sus fibras eferentes hacia otras estructuras y sólo una parte regresa al cuerpo estriado para modular su actividad. Esto favorece la hipótesis de la substantia nigra como salida común de la información procesada en el cuerpo estriado.

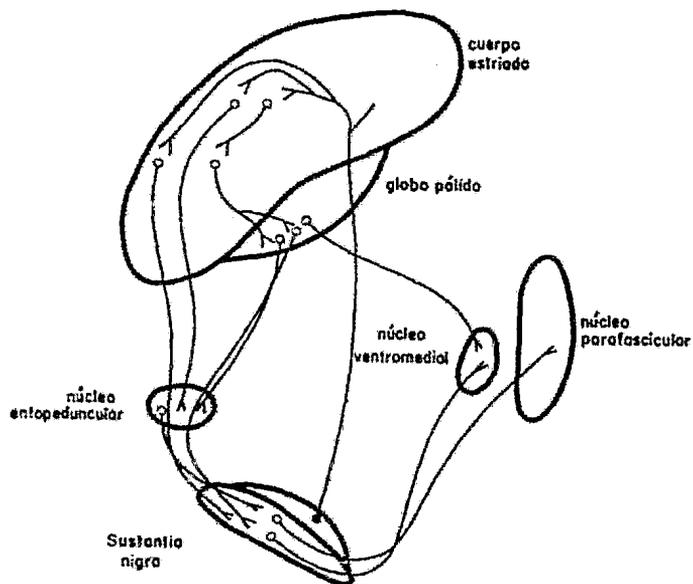


Figura 1: Esquema del Sistema de los Ganglios Basales y de las conexiones GABAérgicas entre ellos. (•← conexión dopaminérgica nigro-estriatal).

CAPITULO II

TRABAJO EXPERIMENTAL

II. TRABAJO EXPERIMENTAL

ANTECEDENTES.

Se ha creado un importante cuerpo de evidencias que indica que las conductas motoras dependientes de dopamina en el cuerpo estriado son mediadas, en buena parte, por el ácido gama amino butírico (GABA).

Es posible relacionar la actividad bioquímica en los ganglios basales con alteraciones motoras en humanos (69, 38). También se ha trabajado intensamente en modelos conductuales que se relacionan con el sistema nigro-estriatal (66) (Ver Sección: Función del GABA en los Ganglios Basales).

Se conocen trabajos en que se describen las vías nerviosas en relación con un neurotransmisor. El transmisor en la vía nigro-estriatal ha sido identificado como dopamina (27). Existe evidencia de que el GABA se encuentra en neuronas intraestriatales y en la vía eferente estriado-nigral (50, 63). Se ha comprobado tanto bioquímica como electrofisiológica y anatómicamente que las vías de salida del estriado al globo pálido y núcleo entopeduncular son GABAérgicas (41, 63). Por último, se han descrito también vías que van desde la sustancia nigra al núcleo ventromedial del tálamo y al núcleo parafascicular, así como del globo pálido hacia el núcleo ventromedial, y todas se han caracterizado como GABAérgicas (70, 22,13) (Ver Sección: Anatomía).

Los diferentes experimentos conductuales sugieren la existencia de una cadena de comunicación en los ganglios basales que tiene como salida común la sustancia nigra (Fig1), donde GABA es el mediador de las conductas dependientes de dopamina (65).

El objetivo de este trabajo es aportar un parámetro bioquímico que ayude a visualizar esta cadena como mediada por GABA. Es decir, si en verdad es una cadena en cascada mediada por este neurotransmisor, al interferir en alguno de sus eslabones, éste afectará a los siguientes. Para probar esta hipótesis, se pretende alterar la cantidad de GABA y de GAD, la enzima limitante en la síntesis de este neurotransmisor, que será el parámetro (Ver Sección: Metabolismo y Enzimas Clave). Con el fin de producir una alteración en la transmisión GABAérgica se destruirán las fibras aferentes dopaminérgicas al estriado mediante la inyección de una toxina específica, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), en el haz del cerebro medio anterior, es decir, en la vía por la que pasan los axones de las células dopaminérgicas que van de la substantia nigra al cuerpo estriado (77) (Ver Sección: Métodos). Con esto se impedirá la llegada de la información dopaminérgica que podría disparar el sistema y se provocará la alteración de la cadena, lo cual se reflejará en la actividad de GAD, actividad que se medirá en el cuerpo estriado, el globo pálido, el núcleo entopeduncular, la substantia nigra y los núcleos ventromedial y parafascicular del tálamo.

PROCEDIMIENTO.

El objetivo de este trabajo es observar si se obtiene una variación de la transmisión GABAérgica en el cuerpo estriado y comprobar si tal variación tiene algún efecto en una serie de estructuras que se conectan unas con otras formando una especie de cadena.

Para obtener estos cambios se propuso impedir la entrada de la información proveniente de la substantia nigra al cuerpo estriado que podría disparar el sistema de estructuras. Con este propósito se destruyeron las células dopaminérgicas de la substantia nigra mediante la aplicación de una toxina específica (6-hidroxidopamina, 6-OHDA) que destruye estas neuronas. Como la toxina produce una lesión mayor cuando se transporta retrógradamente (77), fue conveniente inyectarla en el haz del cerebro medio anterior (Fig. 2).

En esta sección se describe el trabajo experimental realizado. Se discute el diseño experimental, la técnica de la microinyección de la toxina, la disección del tejido, las pruebas bioquímicas para cuantificar la actividad de GAD y la prueba conductual que nos asegura la destrucción de las células dopaminérgicas.

METODOS.

Para este experimento se formaron 3 grupos de ratas Wistar macho, con pesos de 220-250 g. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz oscuridad normal con agua y alimento ad libitum.

Grupo control. Se midió la actividad de GAD en el cuerpo estriado, globo pálido, núcleo entopeduncular, núcleos ventro

medial y parafascicular del tálamo y substantia nigra*, para tener así una medida de la actividad de la enzima en situación control.

Grupos experimentales. En los otros dos grupos, experimentales, los animales fueron inyectados con 6-GHDA en el haz del cerebro medio anterior, previo a la cuantificación de la actividad de la GAD en las mismas estructuras del grupo control.

DISECCION.

Se utilizaron 24 ratas que fueron sacrificadas por dislocación cervical; los cerebros fueron extraídos rápidamente y lavados en solución salina fría. A continuación, sobre hielo seco, se sacaron rebanadas de 1 mm. de espesor y con un "saca-bocados" se disecaron las estructuras. El cuerpo estriado y el globo pálido, por su gran tamaño y fácil acceso, fueron extraídos usando bisturí, tijeras y pinzas para iris curvas. Todas las estructuras fueron secadas con papel filtro, pesadas y guardadas en nitrógeno líquido hasta la realización de la prueba bioquímica. Desde el momento de la muerte de la rata hasta que se extrae la última estructura, el tiempo de disección es de aproximadamente 8 minutos. De acuerdo a reportes anteriores, no hay alteración post-mortem de la enzima sino hasta mucho tiempo después (15,69,38).

DETERMINACION DE GAD.

El ensayo bioquímico consiste en una variación sobre el método de Albers (1). Para esta prueba se preparó un homogenado del tejido en una solución amortiguadora de fosfatos (PH.=6.5), al cual se le agregó una décima parte del volumen original del co-factor de la enzima, fosfato de piridoxal (PLP, Sigma), 10^{-4} M, una centésima parte del borhidrato del

* Abreviaturas: Cuerpo estriado (CE); substantia nigra (SN); núcleo entopeduncular (EP); núcleo ventromedial (VMT); núcleo parafascicular (PF) y globo pálido (GP).

bromuro de 2-amino etil isotiouonio (AET, Sigma) 10^{-2} M y, por último, una centésima parte del volumen original de Triton X-100 (Sigma) al 5.5%.

En un tubo de vidrio de 3.0 mm de diámetro interno y 2.5 cm de altura se puso en contacto una alícuota, 85 μ l del homogenado, con 15 μ l del ácido glutámico con una concentración final de 25 mM y actividad específica de 82 720 dpm/mM (1^{-14} C) (New England Nuclear 100 μ Ci). El tubo que contenía el ácido y el homogenado se conectó herméticamente a otro de iguales características mediante un tubo de latex. En el segundo tubo se colocó hyamina, 30 μ l (Amersham/Searle), que actúa como atrapador del CO_2 que se desprende debido a la descarboxilación del ácido glutámico. Se permitió que la reacción continuara durante 40 minutos a $37^\circ C$ y se detuvo provocando un descenso del pH por la inyección de ácido sulfúrico concentrado (50-70 μ l). Para facilitar la difusión del bióxido de carbono se colocó el dispositivo durante 1 hr. en un horno a $40^\circ C$.

Después del período de difusión, los tubos con hyamina fueron introducidos al líquido de centelleo, 10 ml por muestra. Este líquido se preparó disolviendo 4 g de 2,5 difenil oxazol (PPO, Sigma) y 50 mg de p-bis-(2-(5 fenil oxazolil) benceno (POPOP, Sigma) en un litro de tolueno (Merck). Los viales fueron almacenados en la oscuridad y se contaron al día siguiente para evitar el fenómeno de quimioluminiscencia. La medición de radiactividad se llevó a cabo en un espectrómetro Packard Tri-Carb 300.

DETERMINACION DE PROTEINAS.

Ya que expresar los resultados con base al peso del tejido húmedo puede causar gran variación en los datos y posibles fuentes de error debido a cambios en el peso por acumulación de agua, se decidió expresar la actividad de la enzima en nmolas/h/mg de proteína. Así, el siguiente paso fue la determinación de proteínas de la muestra. Para tal fin se empleó la técnica de Lowry (47).

La aplicación de esta técnica requiere la preparación de varios reactivos que a continuación se describirán:

Reactivo A: Se obtuvo preparando una solución de carbonato de sodio (Baker) al 2%, en sosa 0.1 N.

Reactivo B: Se preparó mezclando una solución de sulfato de cobre (Baker) al 1% con una cantidad igual de tartrato de potasio y sodio al 2% (Mallinckroft).

Reactivo C: Se preparó mezclando 50 partes del reactivo A con una parte del B. Este reactivo se prepara el mismo día de la determinación. En la prueba se empleó un volumen 10 veces mayor que el de la muestra.

Reactivo D: Se preparó mezclando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma) con una cantidad igual de agua. Durante la determinación se utilizó la mitad del volumen de la muestra.

El procedimiento consistió en diluir las muestras, a las que se les añadió el volumen ya mencionado del reactivo C, luego de lo cual se les dejó reposar 10 minutos. A continuación se agregó el reactivo D y se dejó reposar otros 30 minutos, después de lo cual se llevó a cabo la lectura espectrofotométrica.

Para hacer la curva patrón se preparó el siguiente estandar de proteínas: 25 mg de albúmina (Sigma, Fraction V) en 100 ml, lo que dió una concentración de 25 $\mu\text{g}/0.1$ ml. La curva patrón se hizo preparando una serie de tubos, con las siguientes composiciones:

Tubo	Albúmina (ml)	H ₂ O (ml)	Tejido diluído
1	-	.4	-
2	.1	.3	-
3	.2	.2	-
4	.4	-	-

Después de varios grupos piloto, se llegó a la conclusión de que el cuerpo estriado debía diluirse 100 veces; el globo pálido y la substantia nigra 25; el núcleo para-fascicular 20 veces y el entopeduncular y el V.M.T. 8-10 veces.

Las lecturas espectrofotométricas se hicieron a una longitud de onda de 500 nm en un aparato Beckman-B. De las interpolaciones de las curvas estandar se obtuvo la concentración de las proteínas solubles (Fig. 3).

TECNICA PARA LA INYECCION ESTEREOTAXICA.

En esta sección se describirá la técnica empleada para realizar la microinyección estereotáxica de la 6-OHDA en el haz del cerebro medio anterior en los grupos experimentales.

El primer paso fue establecer las coordenadas estereotáxicas, es decir, localizar en función de un punto de referencia fijo, la posición tridimensional de la estructura de interés. Tomando como punto de referencia la sutura Bregma, las coordenadas que obtuvimos fueron: Anteroposterior, -1.7; lateral, -1.5; y vertical, -8.7 (todas en mm). El lugar de la lesión se comprobó contra el Atlas de König y Klippel (Fig.2).

Los animales fueron anestesiados con Equitesin (3.35 ml/Kg de peso), administrado intraperitonealmente. El anestésico se preparó preparando y mezclando las siguientes sustancias: 420 mg de hidrato de cloral en 1.5 ml de agua, 212 mg de sulfato de magnesio en 1.5 ml de agua, 3.90 ml de propilenglicol, 1 ml de etanol y 1.6 ml de nembutal. El volumen final se llevó a 10 ml. (29).

Una vez anestesiados los animales se colocaron en un aparato estereotáxico David Kopf (Fig. 4). Se realizó

una incisión y se expuso el cráneo, sobre el cual se hizo un pequeño trépano (aproximadamente de 2mm de diámetro) por el que se introdujo la aguja de la microjeringa (Hamilton 5 μ l).

Se llevó la jeringa a la posición adecuada y se inyectaron 4 μ l. de una solución que contenía 2 μ g de ácido ascórbico (antioxidante)/1 μ l de solución salina estéril y 8 μ g de 6-OHDA (Sigma) (31). Se inyectó 1 μ l cada 30 segundos y luego se dejó la jeringa en la misma posición otros 30 segundos para permitir la difusión de la toxina, lapso después del cual fue retirada lentamente. La herida fue suturada y se aplicaron 80 000 unidades de Penicilina G (Wyeth-Vales) para prevenir infecciones.

OBSERVACION CONDUCTUAL.

Se dejó que las ratas se recuperaran de la cirugía durante una semana antes de hacer la prueba conductual. Para esta prueba, se inyectó intraperitonealmente apomorfina (Apoteksbolaget), 25 mg/kg (29), y se observó la conducta de giro durante los 30 minutos posteriores a la inyección (Ver sección: Función del GABA en los Ganglios Basales). Se tomó el criterio de que más de 100 vueltas hacia el lado contralateral al sitio de la inyección, en media hora, implican la destrucción de, al menos, el 80% de las células dopaminérgicas de la substantia nigra (52). De esta manera, los animales que formaron los grupos experimentales fueron aquellos que giraron más de 100 veces en 30 minutos (Fig. 5). Después de las pruebas, los animales del primer grupo experimental permanecieron en reposo durante 4 semanas y los del segundo 8 semanas, antes de ser sacrificados para la realización de la prueba bioquímica.

ANALISIS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Para discutir los resultados de un experimento debe tenerse la certeza de que la metodología que se ha escogido es la adecuada para cumplir con los objetivos originales del trabajo, y de que la técnica se ha llevado a cabo correctamente.

Se ha mostrado que hay una buena correlación entre la actividad de la GAD y la concentración del GABA (26), por lo que la medida de la actividad de la enzima es un buen indicador de la presencia de GABA. Por otra parte, se ha reportado que la actividad de la GAD puede ser afectada transinápticamente y que este cambio puede relacionarse con una variación en los niveles del GABA (33). Por lo tanto, la medida de la actividad de la GAD muestra ser un método adecuado para detectar cambios en la transmisión GABAérgica.

Es posible relacionar la conducta de giro con la destrucción de las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra (52). Ya que cada grupo experimental tiene tejido proveniente de varios animales, la prueba conductual asegura que el tejido empleado proviene de ratas que han sido lesionadas correctamente y en las cuales se ha eliminado la inervación dopaminérgica de la substantia nigra al cuerpo estriado del mismo lado en más de un 80%.

Se han publicado varios estudios sobre la actividad de la GAD en diversas estructuras cerebrales de diferentes especies animales. En particular se conocen estudios exhaustivos sobre la actividad de la GAD en la rata. Estos estudios fueron consultados para comparar los resultados del grupo control. Al ver el trabajo de Chalmers et al., 1970, se ha podido comprobar la gran similitud entre los resultados. El trabajo de Tappaz et al., 1976, da resultados que difieren de los del grupo control de este experimento en cuanto a valores absolutos, sin embargo,

las tendencias en cuanto a la actividad se conservan, es decir, se mantiene la proporción y el orden entre las estructuras cerebrales analizadas en ambos trabajos, como por ejemplo en la substantia nigra donde se reporta la mayor actividad. Es posible responsabilizar las diferencias en los valores absolutos a las distintas técnicas de disección que, en el caso de estos investigadores, fue una microdisección sobre rebanadas obtenidas en crióstato, que proporciona una mejor separación de las estructuras con respecto a cualquier otra porción de tejido neuronal.

Al comparar los resultados de las estructuras de ambos lados del cerebro en el grupo control, puede verse que son casi idénticas. Esto habla en apoyo de que la técnica es confiable y que los resultados obtenidos son un reflejo fiel de la actividad de la GAD.

El caso del núcleo entopeduncular (EP) y del núcleo ventromedial del tálamo deben discutirse por separado. Hay que tomar en cuenta que en el grupo de 8 semanas de sobrevivencia el aparato que se empleó para cortar las rebanadas se descalibró y éstas no fueron uniformes. Este defecto se comprobó al pesar ambas estructuras y ver que diferían entre ambos grupos experimentales. En ninguna otra estructura estudiada, fuera de las dos que se acaban de mencionar, se detectó esta falta. Es por tanto posible que en el segundo grupo experimental se haya tomado tejido que no correspondía a estas estructuras, lo que indudablemente afecta la validez de esos dos resultados.



Figure 2: Sitio de la inyección de la 6-hidroxidopamina.

(Tomado de Koning y Klippel, 1963).

FIGURA 3

Se presentan las curvas patrón para la determinación de proteínas, para el grupo control.

La primera gráfica se utilizó para cuantificar la cantidad de proteína en globo pálido, estriado y substantia nigra; en la segunda para el entopeduncular, el núcleo ventromedial y el núcleo parafascicular.

Los resultados de densidad óptica del tejido se interpolaron para obtener la concentración en $\mu\text{g}/.1 \text{ ml}$. El volúmen siempre fue de $400 \mu\text{l}$.

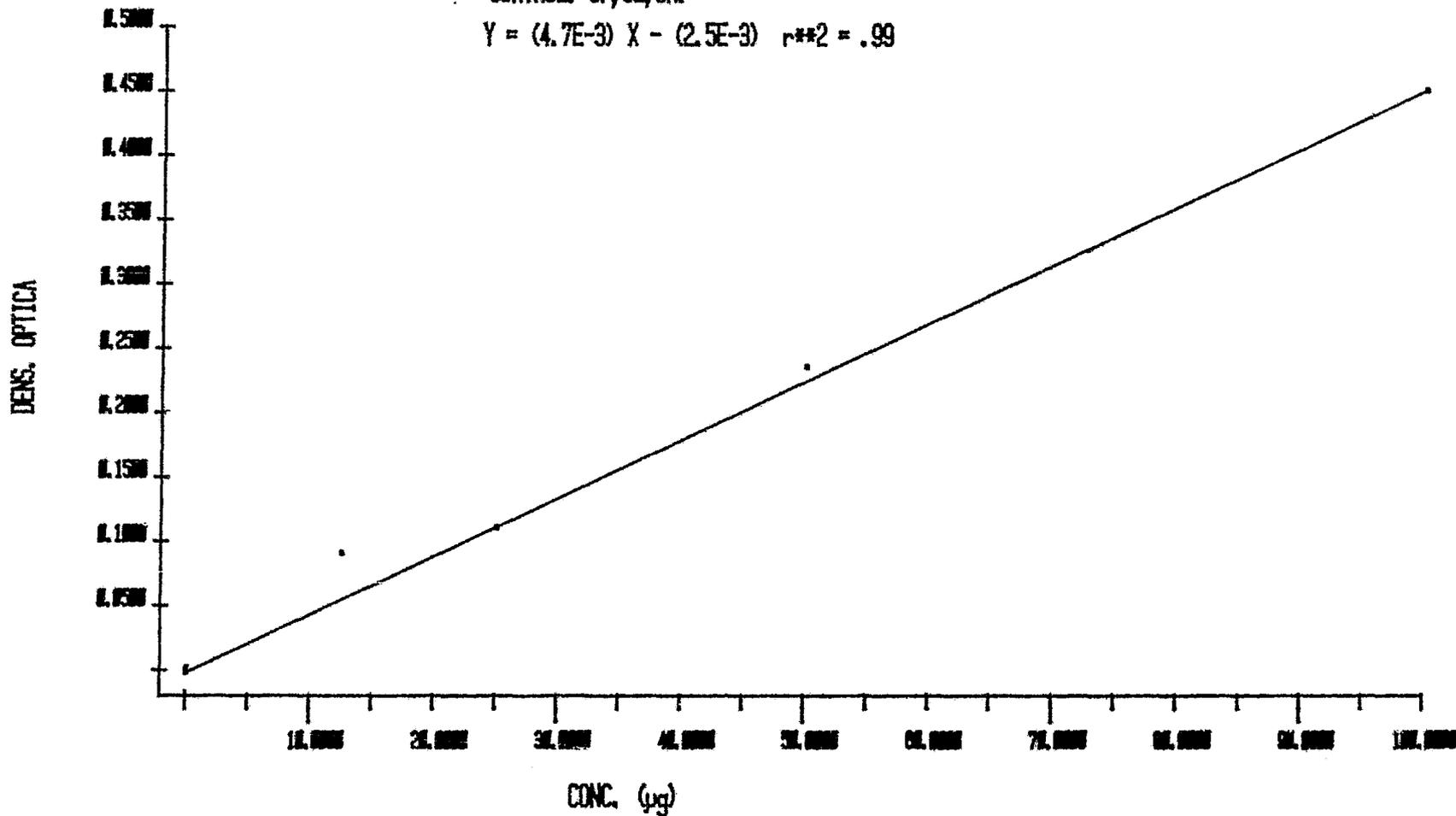
Para obtener la concentración de proteínas en mg/ml se realiza la siguiente operación

$$\frac{\mu\text{g} \times \text{dilución}}{400} = \text{mg/ml}$$

CONTROL. GP, CE, SN.

DETERMINACION DE PROTEINAS.

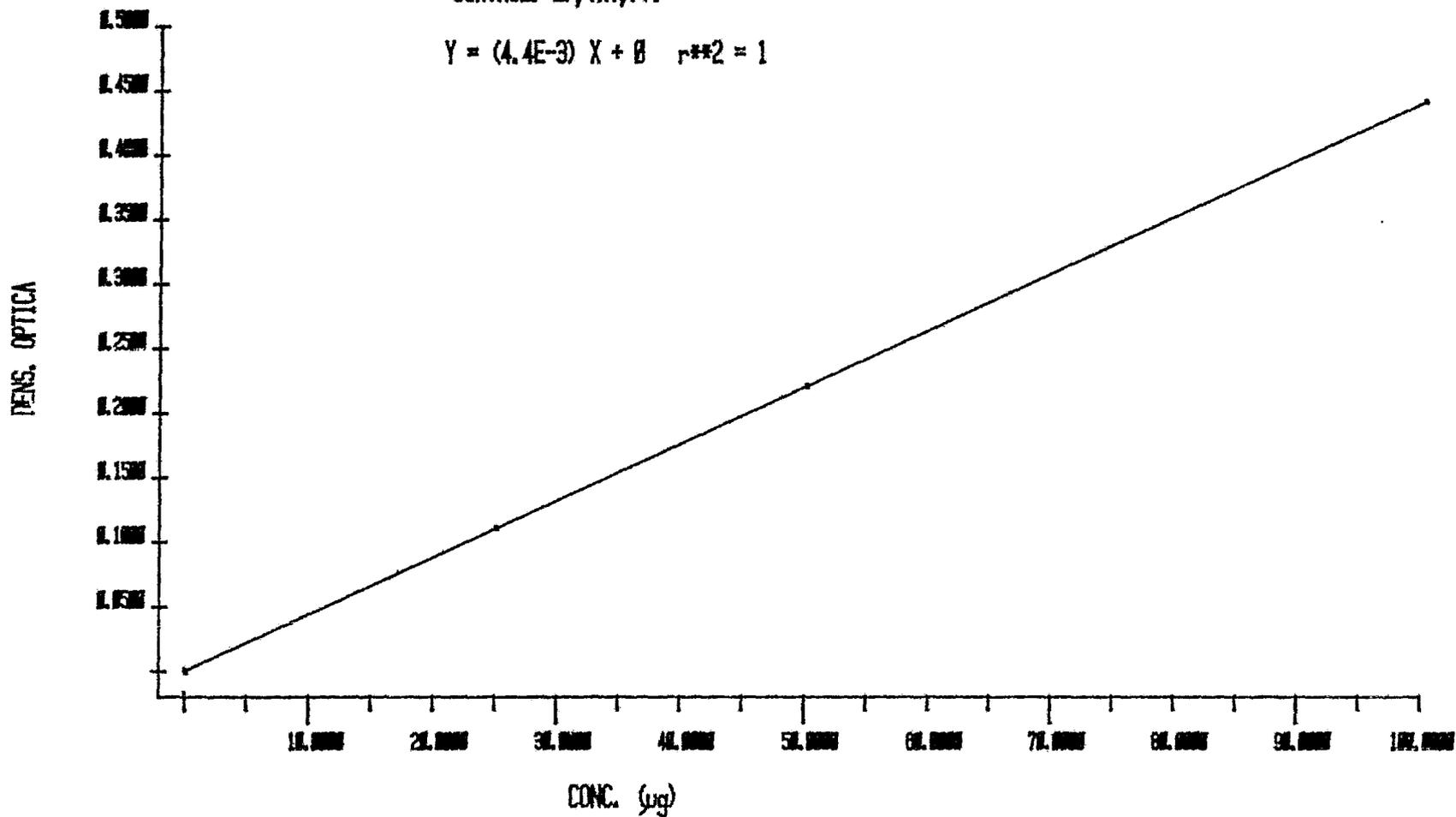
$$Y = (4.7E-3) X - (2.5E-3) \quad r^{**2} = .99$$



CONTROL. EP, VMT, PF.

DETERMINACION PROTEINAS.

$$Y = (4.4E-3) X + 0 \quad r^{**2} = 1$$



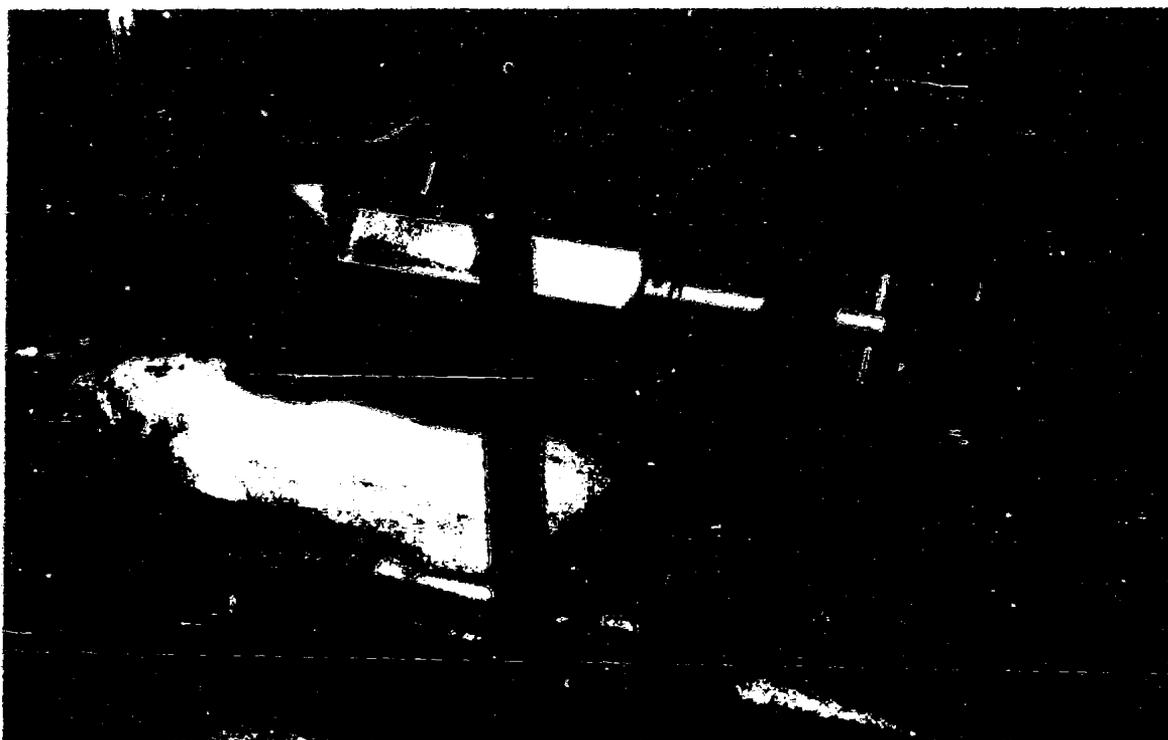


Figura 4: Rata montada en un aparato estereotáxico (David Kopf), durante la inyección estereotáxica de la 6-hidroxidopamina.

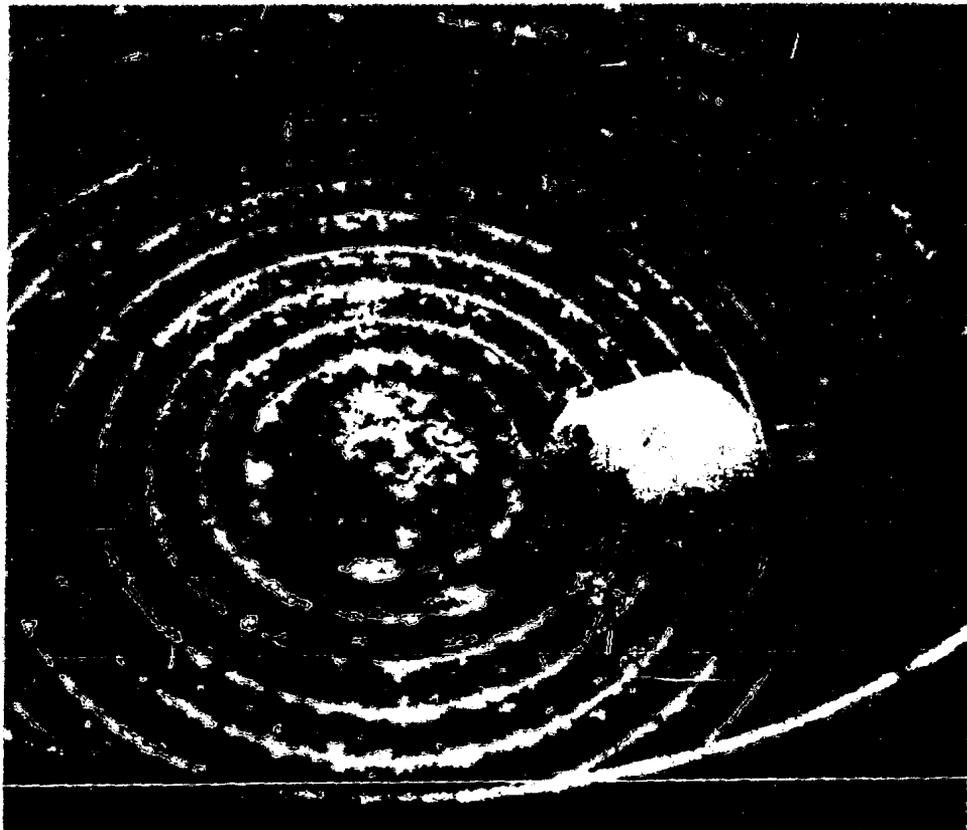


Figura 5: Rata lesionada con 6-OHDA y girando contralateralmente debido a la inyección intraperitoneal de apomorfina.

RESULTADOS

Aquellos animales lesionados con 6-OHDA que giraron en promedio 223 veces/30 min. fueron seleccionados para este estudio. Después de esta prueba conductual bajo la administración del agonista dopaminérgico apomorfina, los animales sobrevivieron por un período de 4 u 8 semanas. Los resultados de la actividad enzimática se expresan en nM/hr/mg de proteína del tejido.

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL GRUPO CONTROL CONTRA EL GRUPO CON UN PERIODO DE SOBREVIVENCIA DE 4 SEMANAS:

En la tabla No 3 se pueden observar los valores obtenidos para cada grupo, tanto para aquellos que no recibieron lesión alguna (grupo control), como para los que sobrevivieron 4 u 8 semanas después de la prueba conductual.

Como puede observarse en la gráfica A , los valores de la actividad enzimática para el lado ipsilateral a la lesión se redujeron significativamente tanto para el cuerpo estriado como para el núcleo entopeduncular. Hubo, en el mismo lado de la lesión, un aumento significativo en la actividad del GAD, tanto para el globo pálido como para la substancia nigra reticulada. El lado contralateral a la lesión permaneció sin cambio, tanto para el globo pálido como para el núcleo entopeduncular. Por el contrario, hubo un cambio significativo para el lado contralateral en el cuerpo estriado y en la substancia nigra. En el primer caso consistió en una disminución y en el segundo en un aumento paralelos al cambio observado en el mismo lado de la lesión. Como se discute posteriormente, los cambios que se observan en los núcleos talámicos fueron difíciles de cuantificar y por lo tanto no muy confiables, sin embargo puede observarse un pequeño aumento no significativo para el núcleo

ventromedial en el mismo lado de la lesión y una disminución significativa en el lado contrario. En el núcleo parafascicular se observa una disminución significativa simétrica en ambos lados.

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL GRUPO CONTROL CONTRA EL GRUPO CON UN PERIODO DE SOBREVIVENCIA DE 8 SEMANAS:

En la tabla No 3 se pueden observar los valores obtenidos para cada grupo. Como puede observarse en la gráfica

B, en el lado ipsilateral a la lesión hay una disminución significativa en la actividad de la GAD en el cuerpo estriado, en el globo pálido y en la substantia nigra reticulada, y se observa un aumento en el núcleo entopeduncular de ese mismo lado. Para el lado contrario a la lesión, al comparar los datos contra el grupo control, la actividad disminuye tanto para el cuerpo estriado, como para el globo pálido y la substantia nigra. El núcleo entopeduncular contralateral aumenta también su actividad. En cuanto a los núcleos talámicos, que se analizan con reservas (ver sección Análisis del Trabajo Experimental), en ambos núcleos ventromediales del tálamo se observa un aumento pequeño en la actividad y en ambos núcleos parafasciculares se observa una disminución.

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA UTILIZANDO EL LADO NO LESIONADO COMO EL CONTROL:

Este tratamiento para los datos se justifica por el hecho de que en el grupo con un período de sobrevivencia de 8 semanas, aparentemente la actividad general de la enzima es baja en la mayoría de las estructuras, tanto para el lado contralateral como para el ipsilateral comparando los resultados con el grupo control.

GRUPO CON UN PERIODO DE SOBREVIVENCIA DE 4 SEMANAS:

En la tabla No 4 , están expresados los resultados tomando el lado contralateral como el 100% de la actividad. En este caso las diferencias más marcadas entre ambos hemisferios son para el núcleo ventromedial del tálamo y la substantia nigra, con un 100 y un 56% de aumento respectivamente. Y para el núcleo entopeduncular con un 79% de disminución.

GRUPO CON UN PERIODO DE SOBREVIVENCIA DE 8 SEMANAS:

En la tabla No 4 están expresados los resultados tomando el lado contralateral como el 100% de la actividad. En este caso son tres las estructuras que tienen un aumento porcentual, entre hemisferios, muy similar. Para el cuerpo estriado es de 37%, para el globo pálido de 36% y para el núcleo entopeduncular de 39%. La diferencia entre la substantia nigra en ambos lados es de una disminución en el lado lesionado de un 18%.

ACTIVIDAD DE LA GAD EN nM/hr/mg proteína

Estructuras	Grupos			
	Control	Promedio del Control	Sobrevivencia	Sobrevivencia
			4 semanas	8 semanas
Cuerpo estriado				
I	230		130 **	110 **
C	240	235	130 **	80 **
Globo pálido				
I	310		530 **	230 **
C	320	315	340 **	170 **
N.Entopeduncular				
I	110		30 **	250 **
C	110	110	114	180 **
Substantia nigra				
I	470		680 **	230 **
C	500	485	650 **	280 **
N.Ventromedial				
I	70		80	110
C	80	75	40	110
N.Parafascicular				
I	170		140	140
C	180	175	140	130

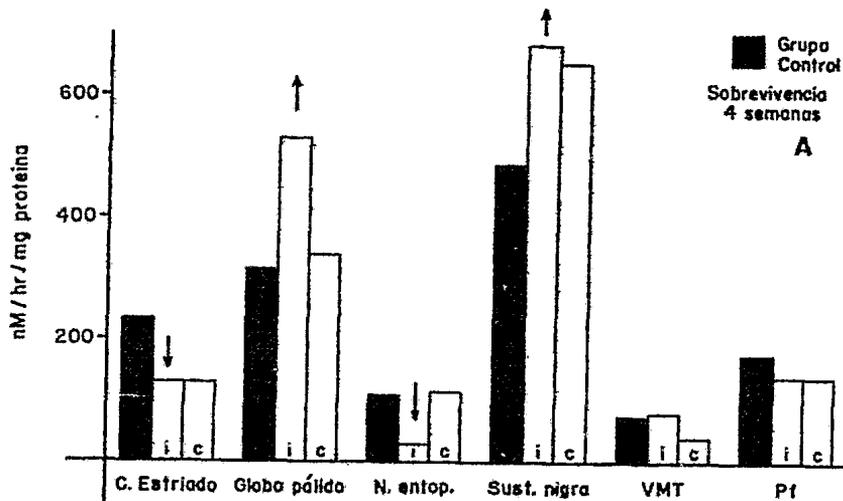
Tabla No 3. Se expresan los valores de actividad enzimática para cada grupo.

I= lado ipsilateral (derecho); C= lado contralateral (izquierdo) al sitio lesionado con 6-OHDA. *= $p > 0.05$; **= $p > 0.001$.

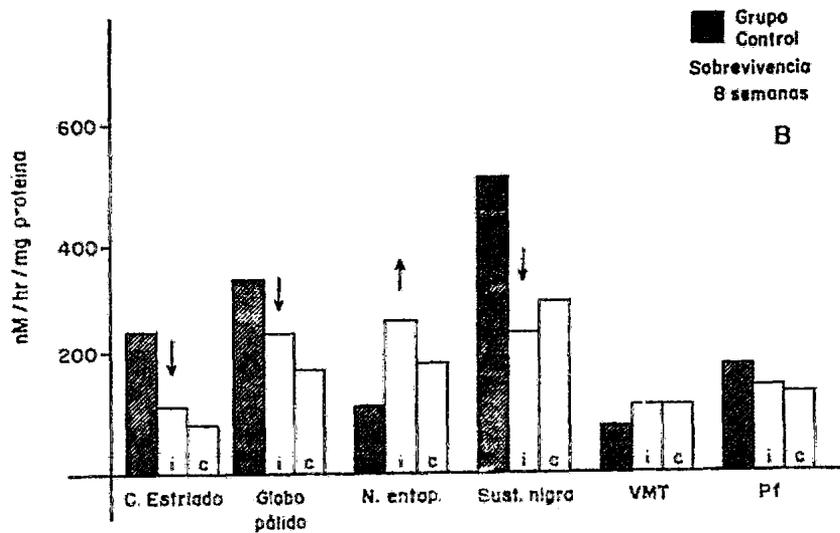
COMPARACION PORCENTUAL ENTRE HEMISFERIOS

ESTRUCTURAS	GRUPOS	
	Sobrevivencia 4 semanas	Sobrevivencia 8 semanas
Cuerpo estriado	--	+ 37
Globo pálido	+ 56	+ 36
N. Entopeduncular	- 79	+ 39
Substantia Nigra	+ 5	- 18
N. Ventromedial	+100	--
N. Parafascicular	--	+ 8

Tabla No 4. Para esta comparación se utilizó el lado no lesionado como el 100% de la actividad enzimática. +, el lado ipsilateral a la lesión tiene mayor actividad de GAD. -, el lado contralateral a la lesión tiene menor actividad enzimática.



Gráfica A: Actividad del GAD para el grupo experimental con un período de sobrevivencia de 4 semanas, comparado contra el promedio de actividad del grupo control (barras rayadas). I= actividad en el lado ipsilateral a la lesión; C= actividad en el lado contralateral. Las flechas indican la dirección del cambio más significativo (ver texto).



Gráfica B: Actividad del GAD para el grupo experimental con un período de sobrevivencia de 8 semanas, comparado contra el promedio de actividad del grupo control (barras rayadas). I= actividad en el lado ipsilateral a la lesión; C= actividad en el lado contralateral. Las flechas indican la dirección del cambio más significativo (ver texto).

C A P I T U L O I I I

D I S C U S I O N

DISCUSION

El resultado principal de este trabajo confirma, en cierta medida, la hipótesis de trabajo: la alteración en la transmisión dopaminérgica en el cuerpo estriado causa una alteración en la actividad enzimática de la GAD, en diferentes estructuras encadenadas a la salida del cuerpo estriado.

Como se discutió en la sección Función del GABA en los ganglios basales, si los estudios anatómicos y bioquímicos están en lo correcto, a la salida del cuerpo estriado existe una vía inhibitoria, posiblemente tónica, sobre el globo pálido, el núcleo entopeduncular, la substantia nigra y núcleos talámicos. Se deseó averiguar con este estudio de qué manera está encadenada esta vía, esto es, si existen relevos sinápticos en alguna estructura. Debido a que aparentemente podría pensarse que los resultados de ambos grupos experimentales difieren se discutirán por separado.

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL GRUPO CONTROL CONTRA EL GRUPO CON UN PERIODO DE SOBREVIVENCIA DE 4 SEMANAS:

Analizando los resultados del lado ipsilateral, se observa un cambio secuencial entre las estructuras anatómicamente encadenadas (Fig.1), una disminución en la actividad de GAD en el cuerpo estriado, y como resultado un aumento en la misma actividad enzimática en el globo pálido; esto se traduce en una inhibición de la actividad en el núcleo entopeduncular, lo que posiblemente lleva a un aumento en la actividad del mismo lado en la substantia nigra (Gráfica A). Se ha propuesto que diferentes regiones de la substantia nigra reticulada se proyecten al núcleo ventromedial y al núcleo parafascicular del tálamo; esto quizá podría explicar un cambio en la substantia nigra, y como resultado un aumento pequeño de la actividad en el núcleo ventromedial mientras

que produce una disminución en el núcleo parafascicular.

Se tienen bastantes referencias sobre cambios asimétricos en ambos hemisferios. Así, se sabe que al aplicar acetilcolina en un núcleo caudado, aumenta la liberación del GABA en la parte anterior de la substantia nigra ipsilateral y disminuye en la contralateral anterior, lo que indica que la facilitación colinérgica en un cuerpo estriado influye en forma opuesta en las neuronas estriado-nigrales del otro (6). También es conocido que la estimulación eléctrica de un núcleo parafascicular implica un decremento en la liberación de dopamina en los dos cuerpos estriados o en las dos substantiae nigrae, o bien, sólo en el núcleo caudado y substantia nigra contralateral (16). Esto podría explicar por qué en el caso del cuerpo estriado, la substantia nigra y los núcleos talámicos, se observan cambios en la actividad enzimática con respecto al grupo control y al lado ipsilateral a la lesión (gráfica A). Aún no está claro cómo se llevan a cabo estos cambios interhemisféricos, ya que a diferentes tratamientos la dirección del cambio es diferente y además porque a la fecha no existen descritas conexiones directas entre ambos grupos de núcleos (17).

Estudios anatómicos sugieren una vía de conexión entre el globo pálido y el núcleo entopeduncular además de la vía descrita entre el cuerpo estriado y el núcleo entopeduncular. Nuestros resultados parecen indicar que es la vía del globo pálido al núcleo entopeduncular la que mayor relevancia tiene para estos cambios secuenciales observados.

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL GRUPO CONTROL CONTRA EL GRUPO CON UN PERIODO DE SOBREVIVENCIA DE 8 SEMANAS:

Si tomamos en cuenta las conexiones anatómicas, podría decirse entonces que el primer cambio de este grupo con respecto al grupo de 4 semanas de sobrevivencia ocurre a nivel del globo pálido. En este caso se observa una disminución significativa en la actividad enzimática, la cual po-

dría ser debida a que después de 8 semanas de haber producido una lesión en la vía dopaminérgica que inerva al cuerpo estriado, se produjera una degeneración transináptica en el (9) globo pálido, dando como consecuencia una disminución en la actividad de la enzima también en esa región. De ser así, coincide entonces con los resultados del grupo anterior (4 semanas) en cuanto a que si las conexiones se mantienen, se esperaría que ante una disminución en la actividad de GAD en el globo pálido, se viera un aumento en la actividad enzimática del núcleo entopeduncular del mismo lado y una consiguiente disminución en la actividad de la enzima en la sustancia nigra (Gráfica B). Como se discutió en la sección Análisis del Trabajo Experimental, este grupo en particular se vió afectado en la disección de los núcleos a nivel talámico, por lo que los resultados no serán discutidos. En cuanto a los cambios en el lado contralateral, aunque menos aparentes en este caso, parecen seguir un patrón asimétrico como el que describen Glowinsky y sus colaboradores (15).

Estudios que consisten en tratamientos prolongados con bloqueadores de los receptores dopaminérgicos han reportado cambios en la actividad de la enzima limitante en la síntesis de la dopamina, la tirosina hidroxilasa (44). Estos estudios muestran un efecto bifásico en la actividad de la enzima que tiene primero un incremento de actividad y luego desciende por debajo del control. Esto llevó a pensar que si éste fuera el caso para nuestros resultados, la comparación exclusiva contra el grupo control llevaría quizá a conclusiones erróneas. Por eso se analizaron los datos expresados en la tabla No 4. Sin embargo hay que notar que en nuestro caso los cambios en la actividad enzimática no son constantes para todas las estructuras, ni para ambos grupos experimentales. Por ejemplo, en el caso de 8 semanas de sobrevivencia, donde la enzima parece tener una menor ac-

tividad en general, tiene en realidad mayor actividad en el núcleo entopeduncular, que concuerda más con la idea de que resulta de una alteración producida a nivel del globo pálido. Sin embargo no hay que dejar de subrayar la posibilidad de que los resultados sean sólo el reflejo de un cambio generalizado en la actividad de la enzima.

En general podría concluirse que el cuerpo estriado, el globo pálido, el núcleo entopeduncular y la substantia nigra están encadenados en una vía inhibidora, cuyo neurotransmisor es el GABA. Así, cuando una actividad inhibidora se elimina, el núcleo que la recibe, al desinhibirse de tal acción crónica, aumenta su actividad, lo que se traduce en una inhibición a la siguiente estructura en la cadena, y esta mayor inhibición se traduce, un eslabón más allá, en un aumento de actividad (Fig. 6) (39)

Estas conclusiones están apoyadas por los resultados obtenidos por medio de la cuantificación de la actividad de glucosa marcada. En estos estudios se ha observado que cambios en la actividad en el cuerpo estriado se traducen en cambios a lo largo de la cadena. Así al inyectar dopamina intracstrialmente, se observa un aumento en la utilización de glucosa en el entopeduncular, la substantia nigra y habenu-
la lateral (8). Estudios recientes de utilización de glucosa, posteriores a la lesión de las células dopaminérgicas de la substantia nigra con 6-hidroxidopamina, muestran un aumento de utilización de glucosa en el globo pálido ipsilateral a la lesión (79). Los autores atribuyen este efecto a una disminución de la neurotransmisión dopaminérgica en el cuerpo estriado. Sin embargo, no se detectaron cambios ni en el estriado ni en el núcleo entopeduncular, lo que sugiere que las proyecciones estriatales al globo pálido no se encuentran reguladas de la misma manera que las que van al núcleo entopeduncular y a la substantia nigra. Parece válido establecer una comparación entre los resultados de aumento de

actividad de la GAD en el globo pálido y el incremento en la utilización de glucosa, ya que esta última técnica no puede discernir si el aumento sucede en las terminales nerviosas o en las somas celulares. En este caso los cambios en la sustantia nigra no son tan importantes como en el nuestro, quizá porque su método mide actividad de todo tipo de terminales y somas, y nuestra técnica se limita a la actividad del GAD.

Es así que creemos válido extraer, como conclusiones de este trabajo, dos sugerencias sobre la organización de las conexiones nerviosas en los ganglios basales que son:

1) Insistir en que el relevo sináptico que tiene lugar en el núcleo entopeduncular, de la vía proveniente del globo pálido, tiene más importancia que la que sale directamente del cuerpo estriado y 2) La posibilidad de que el mecanismo regulador de la vía eferente estriado-nigral, sea diferente al mecanismo modulador de la vía eferente estriado-palidal.

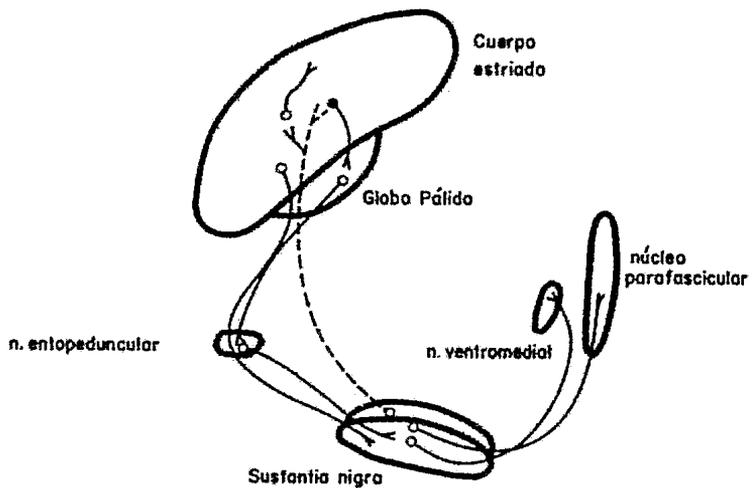


Figura 6: Cadena de estructuras propuesta según los resultados obtenidos. La vía punteada es la vía dopaminérgica nigroestriatal, que fue lesionada 4 u 8 semanas antes de la determinación de la actividad del GAD. ● es la neurona que se propone sufre degeneración transináptica al cabo de 8 semanas (ver texto).

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALBERS, W.R. and BRADY R., The Distribution of Glutamic Decarboxylase in the Nervous System of the Rhesus Monkey. *J. Biol. Chem.* 234, 926-29 (1959).
- 2) ALDERMAN, L.J. and SCHELLEMBERGER, γ -Aminobutyric Acid (GABA) in the Rat Brain: Re-evaluation of Sampling Procedures and Post-mortem Increase. *J. Neurochem.* 22, 937-40 (1974).
- 3) ARNT, J. and SCHEEL-KRÜGER J., GABAergic and Glycinergic Mechanisms within the substantia nigra: Pharmacological Specificity of Dopamine-Independent Contralateral Turning Behavior and Interactions with other Neurotransmitters. *Psychopharm.* 62, 267-77 (1979).
- 4) AWAPARA, J. et al., Free γ -Aminobutyric Acid in Brain. *J. Biol. Chem.* 187, 35-39 (1950).
- 5) BAXTER, F.C., Some recent Advances in Studies of GABA Metabolism and Compartment, in: *GABA in Nervous System Function*, Roberts, E., Chase, N.T. and Tower, B.D. (Eds). Raven Press (1976)
- 6) BESSON, J.M. et al., Bilateral Asymmetrical Changes in the Nigral Release of [^3H] GABA Induced by Unilateral Application of Acetylcholine in the Cat Caudate Nucleus. *Brain Res.* 241, 241-48 (1982).
- 7) BLINDERMAN, M.J., MAITRE M. and MANDEL, P., Studies on Glutamate Decarboxylase of the Mammalian Brain, in: *GABA-Biochemistry and Central Nervous System Function*. Mandel, P. and De Feudis, F. (Eds). Plenum Press (1978).
- 8) BROWN L. and WOLFSON L., A Dopamine-Sensitive Striatal Efferent System Mapped with [^{14}C] Deoxyglucose in the Rat, *Brain Res.* 261, 213-229 (1983).

- 9) BRODAL, A., Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine. Oxford University Press (1981).
- 10) BROWNSTEIN, J.M. et al. On the Origin of Substance P and Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) in the Substantia Nigra. Brain Res. 135, 315-23 (1977).
- 11) CARLSSON, A. and LINDQUIST, M., Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain. Acta Pharmacol. Toxicol. 20, 140-44 (1963).
- 12) CARPENTER, B.M. Anatomy of the Corpus Striatum and Brain Stem Integrating Systems. Handbook of Physiology. Vol.II. American Physiological Society (1981).
- 13) CARTER, A.D. and FIBIGER, C.H., The Projection of the Entopeduncular Nucleus and Globus Pallidus in Rat as Demonstrated by Autoradiography and Horseradish Peroxidase Histochemistry. J.Comp.Neur. 177, 113-24.
- 14) CASH, C. et al., Brain Succinic Semialdehyde Dehydrogenase, in Mandel and De Feudis (Eds), op.cit.
- 15) CHALMERS, A. et al., Distribution of Glutamic Acid Decarboxylase in the Brains of Various Mammalian Species. Comp. Gen.Pharma. 1, 385-90 (1970).
- 16) CHERAMY, A. et al., Effects of Unilateral Electrical Stimulation of Various Thalamic Nuclei on the Release of Dopamine from Dendrites and Nerve Terminals of Neurons of the Two Nigrostriatal Dopaminergic Pathways. Neuroscience (en prensa).
- 17) CHESSELET, F.M. et al., GABA in the Thalamic Motor Nuclei Modulates Dopamine Release from the Two Dopaminergic Nigrostriatal Pathways in the Cat. Brain.Res. (en prensa).
- 18) COOPER, R.J., FLOYD, E.F. and ROTH, H.R., The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Oxford University Press (1978).
- 19) COOLS, A. et al., The Basal Ganglia and the Programing of Behavior. TINS. 4, 124 (1981).

- 20) COTE, L., Basal Ganglia, The Extrapyramidal Motor System and Disease of Transmitter Metabolism, in: Principles of Neural Science. Kandel, R.E. and Schwartz, H.J. (Eds). Elsevier /North Holland (1981).
- 21) COWARD, M.D. Classical and Non-Classical Neuroleptic Induce Supersensitivity of Nigral GABA-ergic Mechanism in Rat. Psychopharm.78, 180-84 (1982).
- 22) DI CHIARA, G. et al., Evidence for a GABAergic Projection from the Substantia Nigra to the Ventromedial Thalamus and the Superior Colliculus of the Rat. Brain Res.176, 273-84 (1979).
- 23) DI CHIARA, G. et al., Evidence that Nigral GABA mediates Behavioural Responses Elicited by Striatal Dopamine Receptor Stimulation. Life Sciences,23,2045-52 (1978).
- 24) DUNNET, B.S. et al., Behavioural Recovery Following Transplantation of Substantia Nigra in Rats Subjected to 6-OHDA lesions of the Nigrostriatal Pathway.1.Unilateral lesions. Brain Res.215,147-61 (1981).
- 25) ENNA, S.J. et al., Alteration of Brain Neurotransmitter Binding in Huntington's Chorea. Brain Res.116,531-37 (1976).
- 26) FAHN, S. and COTE, J.L., Regional Distribution of γ -Aminobutyric Acid (GABA) in the Brain of the Rhesus Monkey. J. Neurochem.15,209-13 (1968).
- 27) FALLON, H.J. and MOORE, Y.R., Catecholamine Innervation of the Basal Forebrain. J.Comp.Neur.180, 540-85 (1978).
- 28) FAULL, M.L.R. and MEHLER, R.W., The Cells of Origin of Nigrotectal, Nigrothalamic and Nigrostriatal Projections in the Rat. Neuroscience 3, 989-1002 (1978).
- 29) FEUERSTEIN, C., Supersensitivity Time Course of Dopamine-Antagonist Binding after Nigrostriatal Denervation: Evidence for Early and Drastic Changes in the Rat Corpus Stratum. Brain Res.226, 221-34 (1981).
- 30) FONNUM, I. et al., Origin and Distribution of Glutamate Decarboxylase in Substantia Nigra of Cat. Brain Res.71, 77-92 (1974).

- 31) FREED, J.W. et al., Restoration of Dopaminergic Function by Grafting of Fetal Rat Substantia Nigra to the Caudate Nucleus: Long-Term Behavioral, Biochemical and Histochemical Studies. *Ann.Neurol.*8,510-19 (1980)
- 32) GALE, K., Chronic Blockade of Dopamine Receptors by Antischizophrenic Drugs Enhances GABA Binding in Substantia Nigra. *Nature.*283, 569-70 (1980).
- 33) GALE, K. and CASU, M., Dynamic Utilization of GABA in Substantia Nigra: Regulation by Dopamine and GABA in the Striatum and its Clinical and Behavioral Implications. *Molecular and Cellular Biochemistry*,39, 369-405 (1981).
- 34) GARCIA-MUÑOZ, M. et al., Feedback loop or output pathway in striato-nigral fibres? *Nature.*265, 363-65 (1977).
- 35) HABER, B., KENIYAMA, K. and ROBERTS, E., L-Glutamic Decarboxylase: A new Type in Glial Cells and Human Brain Gliomas. *Science* 168, 508-9 (1968).
- 36) HAYDEN, R.M., Reflections on the History of Huntington's Chorea. *TIMS.*6, 122-24 (1983).
- 37) HAYS, L.W., *Statistics for the Social Sciences*. Holt, Rinehart and Winston Inc. (1973).
- 38) HORNYKIEWICZ, O., LLOYD, G.K. and DAVIDSON, A., The GABA System, Function of the Basal Ganglia and Parkinson Disease, in: Roberts, E. et al. (Eds), op.cit.
- 39) HUBBARD, I.J., LLINAS R. and QUASTEL, J.M.D., *Electrophysiological Analysis of Synaptic Transmission*. Edward Arnold (Publishers) (1969).
- 40) KIM, S.J. et al., Role of γ -Aminobutyric Acid (GABA) in the Extrapyramidal Motor System² *Exp. Brain.Res.*114,95-104 (1971).
- 41) KITAI, T.S., *Electrophysiology of the Corpus Striatum and Brain Stem Integrating Systems*, in: *Handbook of Physiology*, op.cit.
- 42) KÖNIG, R.F.J. and KLIPPEL, A.R., *A Stereotoxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem*. Williams and Wilkins Co. (1963)

- 43) LANOIR, J., SOGHOMONIAN, J.F. and CADENEL, G., Radioautographic Study of ^3H -GABA Uptake in the Oculomotor Nucleus of the Cat. *Exp. Brain Res.* 48, 137-43 (1982).
- 44) LERNER, P. et al., Haloperidol: Effect of Long-Term Treatment on Rat Striatal Dopamine Synthesis and Turnover. *Science* 197, 181-83 (1977).
- 45) LEVIEL, V. et al., Involvement of the Thalamus in the Asymmetric Effects of Unilateral Sensory Stimulus on the Two Nigrostriatal Dopamine Pathways in the Cat. *Brain Res.* 223, 257-72 (1981).
- 46) LINDGREN, S., ANDEM, E.N. and GRABOWSKA-ANDEN, M., A Fluorimetric Method for Determination of GABA in Tissues Following Cation Exchange Chromatography and condensation with O-Phtaldehyde. *J. Neural Transmission* 55, 243-52 (1982).
- 47) LOWRY, H.O. et al., Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-75 (1951).
- 48) MAITRE, M., OSSALA, L. and MANDEL, P., GABA-Transaminase of Mammalian Brain, in Mandel and De Feudis (Eds), op.cit.
- 49) Mc GEER, L.P., ECCLES, C.J. and McGEER, G.E., *Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain*. Plenum Press (1980)
- 50) McGEER, L.P., McGEER, G.E. and HATTORI, L., *Biochemical Interactions in the Basal Ganglia*.
- 51) MEHLER, R.W., *The Basal Ganglia Circa 1982*. *Appl. Neurophysiol.* 44, 261-90 (1981).
- 52) MITCHELL, I. and REDGRAVE, P., Effects of Partial, Unilateral, Nigrostriatal lesions and Striatal Histofluorescence and Behavioural Indices of Dopamine Transmission. *Proceedings of the B.P.S.* April (1980).
- 53) MORONI, F., GABA Turnover as a Tool to Explore the Function of GABAergic synapses: Physiological and Pharmacological Studies, in: Mandel and De Feudis (Eds), op.cit.
- 54) MORRISON, T.R. y BOYD, R.N., *Química Orgánica*. Fondo Educativo Interamericano, S.A. (1978).

- 55) OKADA, Y. et al., Role of γ -Aminobutyric Acid (GABA) in The Extrapyrarnidal Motor System. *Exp.Brain.Res.* 13, 514-18 (1971).
- 56) OKADA, Y. and HASSLER, F., Uptake and Release of γ -Amino-butyric Acid (GABA) in Slices of Substantia Nigra of Rat. *Brain Res.* 149, 214-17 (1973).
- 57) PERRY, T.L., HANSEN, S. and KLOSTER, M., Huntington's Chorea Deficiency of γ -Aminobutyric Acid in Brain. *N.Engl. J.Med.* 288, 337-42 (1973).
- 58) RACAGNI, G., CATTABENI, F. and GROPETTI, A., Relevance of GABA in the Nigro-striatal System, in: Mandel and De Feudis (Eds), op.cit.
- 59) REBEC, V.G. and LEE, H.E., Differential Subsensitivity of Dopaminergic and Nigrostriatal Neurons to Apomorphine with Long-Term Treatment. *Brain Res.* 250, 188-92 (1982).
- 60) REAVILL, C. et al., GABA Mediated Circling from Substantia Nigra. *Nature* 287, 368 (1970).
- 61) ROBERTS, E. and FRANKEL, S., γ -Aminobutyric Acid in the Brain: Its Formation from Glutamic Acid. *J.Biol.Chem.* 187, 55-63 (1950).
- 62) SCHWARTZ, H.J., Chemical Basis of Synaptic Transmission, in Kundel and Schwartz (Eds), op.cit.
- 63) SCHEEL-KRÜGER, J., MAGELUND, G. and OLIANAS, C.M., Role of GABA in the Striatal Output System: Globus Pallidus, Nucleus Entopeduncularis, Substantia Nigra and Nucleus Subthalamicus. *Adv. in Biochem. Psychopharm.* Vol.30
- 64) SCHEEL-KRÜGER, J., MAGELUND, G. and OLIANAS, C.M., The Role of GABA in the Basal Ganglia and Lymbic System for Behaviour. *Adv. in Biochem. Psychopharm.* Vol.29.
- 65) SCHEEL-KRÜGER, J. and MAGELUND, G., GABA in the Entope-duncular Nucleus and the Subthalamie Nucleus Participates in Mediating Dopaminergic Striatal Output. *Life Sciences* 29, 1552-55 (1981).

- 66) SCHEEL-KRÜGER, J., GABA: An Essential Moderator and Mediator in the Basal Ganglia System of Dopamine Related of Functions. *Acta Neurol.Scand.*65, suppl.90,40-45 (1982).
- 67) SIEGEL, G.J. et al., *Basic Neurochemistry*. Little Brown Co. (1981).
- 68) SPERK, G. and SINGER, A.F., In Vivo Synthesis of Substance P in the Corpus Striatum of the Rat and its Transport to the Substantia Nigra. *Brain Res.*238, 127-35 (1982).
- 69) SPOKES, E.G.S., The Neurochemistry of Huntington's Chorea. *TINS.*4, 111-18 (1981).
- 70) STARR, S.M. and KILPATRICK, C.I., Distribution of γ -Aminobutyrate in the Rat Thalamus: Specific decrease in the γ -Aminobutyrate Following lesions or Electrical Stimulation of the Substantia Nigra. *Neuroscience* 6, 1095-1104(1981).
- 71) SUGAHARA, M. et al., 4-Aminobutyraldehyde as a Substance Convertible in Vivo to GABA. *J. of Neurochem.*40, 694-96(1983).
- 72) SZE, Y.P., L-Glutamate Decarboxylase, in: Mandel and De Feudis (Eds), *op.cit.*
- 73) TAPIA, R., Bases Bioquímicas de la Transmisión Sináptica: Neurotransmisores. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*, 29, 149-55 (1976).
- 74) TAPPAZ, L.M., BROWNSTEIN, M.J. and PALKOVITS, M., Distribution of Glutamate Decarboxylase in Discrete Brain Nuclei. *Brain Res.*108, 371-79 (1976)
- 75) TARSY, D. et al., Rotational Behavior Induced in Rats by Intranigral Picrotoxin. *Brain Res.*89, 160-65 (1975).
- 76) UNGERSTEDT, U., Striatal Dopamine Release after Amphetamine or Nerve Degeneration Revealed by Rotational Behavior. *Acta Physiol. Scand.*82, 49-68 (1971).
- 77) UNGERSTEDT, U., Postsynaptic Supersensitivity after 6-hydroxidopamine Induced Degeneration of the Nigro-Striatal Dopamine Systems. *Acta Physiol.Scand.*82, 69-93 (1971).
- 78) WHEELER, D.D., A Comparison of Sodium Dependent GABA Transport in Cortical Synaptosomes from Long Evans and Sprague-Dawley Rats. *J.Neurol.Transmission.*55,255-68 (1982)

- 79) WOOTEN, F.G. and COLLINS, C.R., Effects of Dopaminergic Stimulation on Functional Brain Metabolism in Rats with Unilateral Substantia Nigra Lesions. *Brain Res.* 263, 267-75 (1983).
- 80) WRIGHT, K.A. et al., Are the Striato Nigral Fibres the Feedback Pathway?, in: *Psychobiology of the Striatum* Cools et al. (Eds). Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1977).
- 81) WU, J.Y., Purification, Characterization and Kinetic Studies of GAD and GABA-T from Mouse Brain, in: Roberts, Chase and Tower (Eds), *op.cit.*
- 82) YOSHIDA, M. et al., Topographical Distribution of γ -Amino-butyric Acid within the Cat Thalamus: In Relation to Basal Ganglia as Determined by Mass Fragmentography. *J. of Neurochem.* 37, 670-76 (1981).