

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

46  
lej.

FACULTAD DE CIENCIAS

INFLUENCIA PRESINAPTICA DEL ACIDO PIPECOLICO  
SOBRE LA TRANSMISION GABAERGICA EN CORTEZA  
CEREBRAL DE RATON

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el titulo de

BIOLOGO

Presenta

BLANCA ALICIA DELGADO COELLO

MEXICO, D.F.

1987.



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## INDICE

	Página
PROLOGO .....	I
INTRODUCCION .....	II
 <u>PRIMERA PARTE</u>	
CAPITULO I	
TRANSMISION SINAPTICA	
1) TRANSMISION ELECTRICA .....	1
2) TRANSMISION QUIMICA .....	1
CAPITULO II	
NEUROTRANSMISORES	
1) CRITERIOS PARA IDENTIFICAR A UN NEUROTRANSMISOR .....	3
2) NEUROTRANSMISORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL .....	4
3) MECANISMO DE ACCION .....	7
4) RECEPTORES .....	8
5) NEUROMODULACION .....	10
CAPITULO III	
GABA Y TRANSMISION GABAERGICA	
1) GABA COMO NEUROTRANSMISOR DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL .....	13
2) SINTESIS Y METABOLISMO DE GABA .....	14
3) DROGAS QUE INTERACTUAN CON EL GABA .....	15
4) RECEPTORES A GABA .....	17
CAPITULO IV	
ANTECEDENTES Y CARACTERIZACION DEL ACIDO PIPECOLICO	
1) ANTECEDENTES DEL ACIDO PIPECOLICO .....	18

2) METABOLISMO Y DEGRADACION DEL ACIDO PIPECOLICO .....	20
3) RELACION GABA-ACIDO PIPECOLICO .....	21
OBJETIVOS .....	22
HIPOTESIS .....	23

## SEGUNDA PARTE

### CAPITULO V

#### MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES

1) EXPERIMENTOS DE CAPTURA .....	25
2) EXPERIMENTOS DE LIBERACION	
a) POR EL METODO DE INCUBACION .....	26
b) POR EL METODO DE SUPERFUSION .....	27

### CAPITULO VI

#### RESULTADOS

1) CAPTURA DE 3H-GABA EN PRESENCIA DE ACIDO PIPECOLICO ...	28
2) LIBERACION DE 3H-GABA POR EL METODO DE INCUBACION .....	28
3) LIBERACION DE 3H-GABA POR EL METODO DE SUPERFUSION .....	29
DISCUSION .....	31
CONCLUSIONES .....	35
REFERENCIAS .....	36

## PROLOGO

La irritabilidad es una de las características inherentes a los seres vivos, ya que todos ellos responden de alguna manera a los estímulos físicos o químicos de su medio inmediato. Esta capacidad de los organismos ha evolucionado grandemente desde las formas más primitivas hasta las más complejas implicando a su vez, modificaciones estructurales importantes.

Si consideramos a un organismo unicelular como la amiba, encontramos que a pesar de su aparente sencillez, resulta ser una unidad receptora, conductora, efectora e integradora al mismo tiempo.

Por otro lado, el funcionamiento ordenado y eficiente de un organismo multicelular, requiere que todas sus partes realicen sus actividades concertadamente. Para ello, algunos seres pluricelulares como las esponjas, logran un avance en su adaptación, al desarrollar mecanismos de diferenciación de sus células y concomitantemente, una capacidad de recibir y transmitir un estímulo. Estas células son llamadas protoneuronas debido a su capacidad de conducción aún incipiente.

En organismos más avanzados, las células se especializan en la conducción de estímulos y son llamadas neuronas. Con la evolución, las unidades funcionales del sistema nervioso, las neuronas, han sufrido una enorme multiplicación y diversificación de forma, y especialización de función. También ha aumentado la complejidad de las conexiones interneuronales formando grupos y una tendencia a la centralización del tejido neural. Esta centralización destaca ya en artrópodos, moluscos y anélidos hasta los vertebrados. Además de la centralización, en los mamíferos el cerebro adquiere proporciones mayores a las de otros vertebrados lo que al parecer, les ha conferido una mayor adaptabilidad a los cambios ambientales.

Así, en organismos multicelulares complejos existen sistemas encargados de recibir, seleccionar, integrar, almacenar y emitir información como respuesta al estímulo captado. Precisamente son estas las funciones del sistema endócrino y del sistema nervioso, cuyas acciones conjuntas son fundamentales en los procesos homeostáticos de los organismos.

Por su parte, el hombre ha desarrollado las potencialidades de su sistema nervioso en formas diversas creando las herramientas tecnológicas que le permiten caracterizar los fenómenos que ocurren a su alrededor. Dicha caracterización, no se ha limitado a los aspectos descriptivos, sino que ha abarcado distintos niveles de organización de la materia, así como las causas de sus comportamientos. En este caso, el estudio del sistema nervioso no ha sido la excepción y en este trabajo trataremos de visualizar a nivel celular y molecular, la posible existencia de algunos eventos implicados en la regulación de los mecanismos de comunicación interneuronal.

## INTRODUCCION

El ácido pipecólico es un iminoácido endógeno que representa el principal metabolito del catabolismo de lisina en el cerebro. Su estudio comenzó en la década de los cincuenta cuando se identificó como componente de ciertos vegetales entre los que se encuentra ampliamente distribuido. Desde 1953, en que Rothstein y Miller encontraron este iminoácido en la rata, se ha detectado ácido pipecólico en distintos órganos de otros mamíferos y del pollo. También es sobresaliente el hecho de que se han cuantificado niveles altos de ácido pipecólico en individuos que padecen desórdenes del tipo de la hiperpipecolatemia o del Kuchiorokor, los cuales implican retraso mental y degeneración mental progresiva.

Por otra parte, el ácido pipecólico posee características muy especiales que sugieren que pueda desempeñar alguna función en el sistema nervioso central de los mamíferos. Algunas de estas características, son su paso relativamente fácil a través de la barrera hematoencefálica, su acumulación en ciertas regiones del cerebro, y sus cinéticas de captura de alta afinidad y de liberación, observadas en rebanadas y sinaptosomas de cerebro de ratón que son dependientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  respectivamente.

En particular, se ha llegado a relacionar la función del ácido pipecólico con la transmisión mediada por el principal neurotransmisor inhibitorio conocido hasta la fecha, el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Las evidencias principales de ello resultan de observaciones electrofisiológicas realizadas en 1980 y 1982 por el grupo de Takahama y Kasé. Ellos mostraron que este iminoácido endógeno tiene un efecto inhibitorio sobre neuronas de rata, susceptible de ser revertido por bicuculina, que es el antagonista específico de GABA. En estudios "in vitro" en el cerebro de rata, se han determinado efectos del ácido pipecólico sobre la captura y la liberación de GABA que implican variaciones de la cantidad del neurotransmisor en el espacio sináptico. Estas observaciones de Nomura y col. en 1978, y de Okuma y col. en 1979, llevaron a suponer que la función del ácido pipecólico es la de modular la actividad GABAérgica.

Si se consideran los hallazgos de Kasé y col. (1980) y de Takahama y col. (1982); estos sugieren que la modulación tendría lugar a nivel postsináptico. Sin embargo, los hallazgos de Okuma y col. y Nomura y col., sugieren que la modulación ocurre a nivel presináptico.

Esta segunda hipótesis es respaldada por los hallazgos de Gutiérrez y Giacobini realizados entre 1982 y 1985, en que comprobaron que el GABA afecta la unión de 3H-ácido pipecólico, de manera dependiente de la concentración de GABA.

Así mismo, la hipótesis de una modulación presináptica del ácido pipecólico sobre el GABA representa el punto medular de este trabajo, el cual se desarrolla en dos partes. La primera incluye el marco teórico acerca de la transmisión sináptica y los antecedentes del problema. La segunda parte está dedicada a la exposición de la fase experimental y los resultados obtenidos.

## CAPITULO I

### TRANSMISION SINAPTICA

El término sinapsis (del griego, synapsis, unión) fue acuñado por Sherrington en 1906, (91) refiriéndose a la zona de unión entre dos neuronas que a su vez había sido descrita por Ramón y Cajal a partir de 1888 (15). En la sinapsis, las membranas de las neuronas se encuentran muy cercanas, pero nunca establecen una continuidad citoplásmica entre sí. La estructura general de la sinapsis incluye un elemento presináptico que termina en un abultamiento o botón presináptico el cual contiene vesículas sinápticas de 40 a 50 nm y abundantes mitocondrias. Este elemento es separado por un espacio sinéptico, que en general es de 25 nm, del elemento postsináptico que puede ser el cuerpo celular, o dendritas o el axon de otra neurona. Este hallazgo dió lugar a que se estableciera una teoría de la transmisión nerviosa como el medio de comunicación entre una y otra célula. Actualmente se reconocen dos tipos de transmisión sináptica: la transmisión eléctrica y la transmisión química.

#### 1) TRANSMISION ELECTRICA

La característica de este tipo de transmisión es que el agente mediador por el cual se comunican las neuronas es representado por una corriente iónica, de ahí que sean conocidas como sinapsis eléctricas. Este tipo de sinapsis tiene como particularidad histológica, el espacio extracelular, que es de solo 2 nm, establece una relativa continuidad citoplásmica entre las membranas pre y postsináptica a través de puentes semejantes a las uniones en hendidura (gap junctions) descritas en células epiteliales. La transmisión eléctrica es limitada solo por la velocidad de la transmisión electroiónica a través de la sinapsis, por lo que la respuesta al estímulo es casi inmediata. Típicamente el sentido de la transmisión es bidireccional (44).

#### 2) TRANSMISION QUIMICA

Existe una segunda forma de comunicación entre las neuronas que se acepta como la principal en el sistema nervioso de los vertebrados y es la llamada transmisión química. Dicha transmisión, debe su nombre a que involucra la síntesis, almacenaje y liberación de un mensajero químico o neurotransmisor.

Histológicamente, el espacio sináptico es grande (30-50 nm) en comparación al de las sinapsis eléctricas (Fig.1). Esta transmisión implica un retraso sináptico en la respuesta calculado en 0.3 mseg a 1 ó 5 mseg o más debido al tiempo que se requiere para llevarse a cabo los procesos transmisores presinápticos, (liberación del neurotransmisor) y los postsinápticos que son la difusión a través del espacio sináptico y la interacción del transmisor con el receptor postsináptico. El retraso puede llegar a ser mayor cuando interviene un segundo

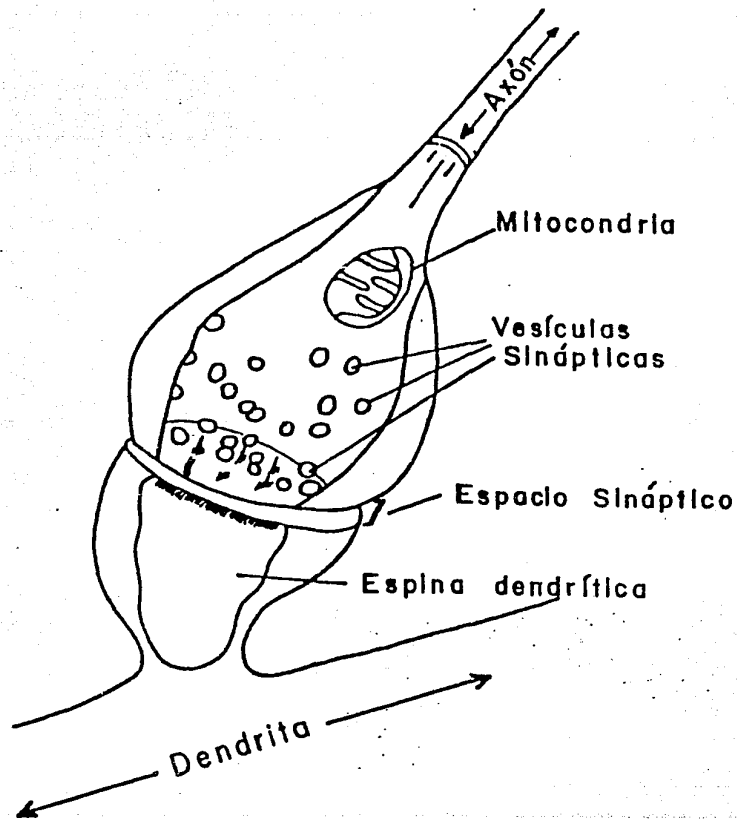


FIG. 1. Esquema de una sinapsis química. La terminal axónica se muestra haciendo sinapsis con una espina dendrítica. La terminal y la espina dendrítica se muestran en un corte que permite ver su interior. En la terminal se muestran los posibles sitios de almacenamiento del neurotransmisor como vesículas. La energía de las células es aportada por las mitocondrias de la terminal. Tomado de Tapiá, R. en Peña, A. (100).



mensajero en la membrana postsináptica, para la activación de los canales iónicos. En general, la transmisión química ocurre unidireccionalmente. La sinapsis química aunque es más lenta, es más flexible ya que interconecta neuronas más variables y complejas. A continuación se detallan los eventos que toman parte en este proceso dado que representan una parte fundamental de este trabajo.

En reposo, la célula nerviosa tiene un potencial de membrana negativo (de  $-60$  a  $-95$  mV) y es relativamente permeable a iones de  $K^+$  y  $Cl^-$  e impermeable a  $Na^+$ . A partir de un estímulo, alcanza un umbral que origina un potencial de acción, durante el cual, la permeabilidad para el  $Na^+$  se invierte, originando una despolarización de la neurona ( $30$  a  $60$  mV). Sin embargo, ni la entrada de  $Na^+$  ni la salida de  $K^+$ , son tan importantes para la liberación del neurotransmisor, como lo es la apertura de canales sensibles al voltaje de la membrana presináptica por los que entra el  $Ca^{++}$ , mecanismo encargado de acoplar el potencial de acción a la liberación del neurotransmisor (44).

Una vez liberado, el neurotransmisor difunde y alcanza la membrana postsináptica donde interactúa con receptores específicos (Fig. 2). La unión del neurotransmisor al receptor, induce un cambio conformacional en este último y posteriormente en el ionóforo lo que resulta en la apertura de una ruta que permite a los iones fluir a través del ionóforo. La interacción del neurotransmisor con el receptor (Fig. 3) continúa mientras éste no sea inactivado, ya sea por degradación enzimática o por un mecanismo de recaptura a través de la terminal sináptica.

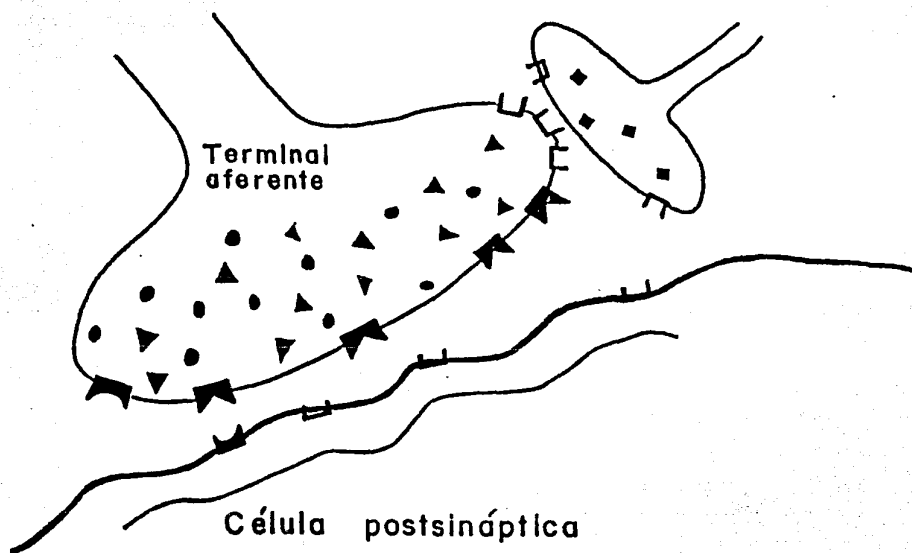


FIG. 2. Receptores pre y postsinápticos a neurotransmisores. Los cuadros, círculos y triángulos representan tres neurotransmisores distintos que se acoplan con sus correspondientes receptores representados por bloques. Aunque probablemente existen muchos patrones en el sistema nervioso, aquí se muestra la terminal aferente que contiene dos neurotransmisores, uno que actúa en las membranas pre y postsináptica, mientras que el otro actúa en la membrana pre sináptica. En la sinapsis entre otra neurona y la terminal aferente, un transmisor diferente tiene receptores en ambas membranas. Tomado de Siegel, G.S. y col. (92).

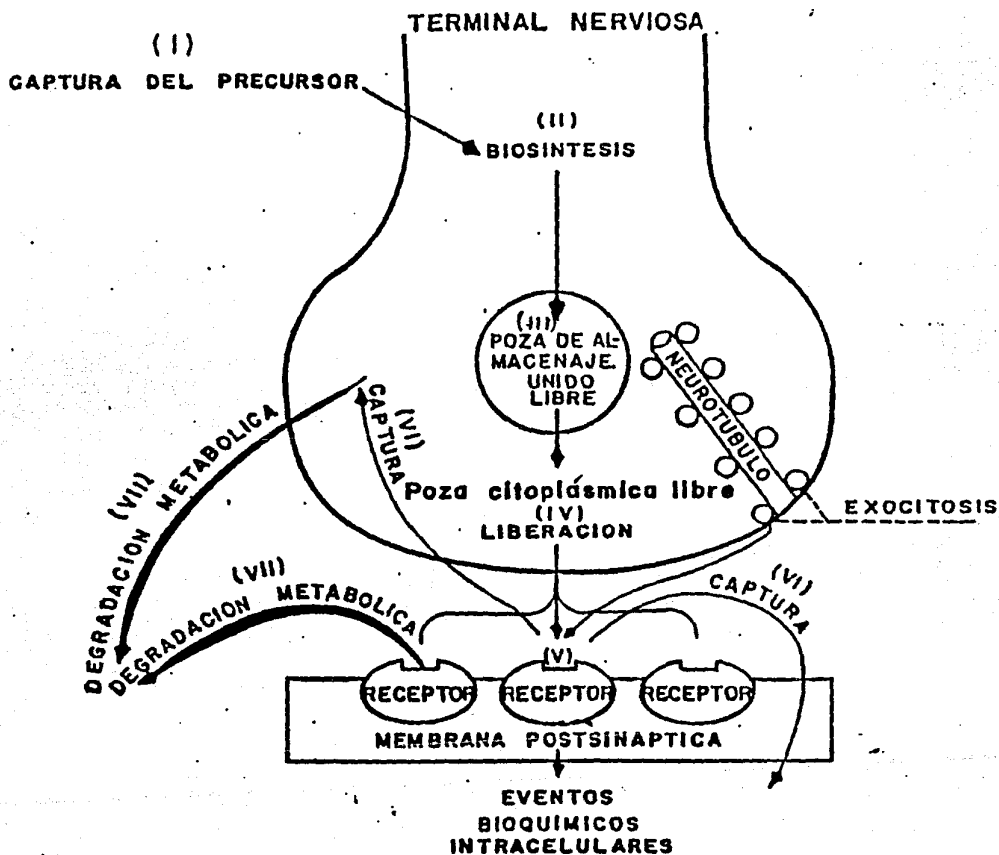


FIG. 3. Esquema funcional de los pasos involucrados en la transmisión nerviosa mediada por un neurotransmisor. I) Captura del precursor hacia la neurona a través de un sistema de transporte. II) Biosíntesis del neurotransmisor. III) Almacenamiento en vesículas donde se encuentra el neurotransmisor parcialmente unido y parcialmente libre. IV) Liberación del neurotransmisor por exocitosis al espacio sináptico. V) Efecto sobre receptores postsinápticos específicos que median una respuesta fisiológica por activación de la membrana y eventos intracelulares. VI y VII) Terminación de los efectos del neurotransmisor por captura (VI) hacia las terminales presinápticas o hacia células postsinápticas o por degradación (VII) a nivel pre o postsináptico o después de difusión hacia el medio extracelular.

## CAPITULO II

### NEUROTRANSMISORES

#### 1) CRITERIOS PARA IDENTIFICAR A UN NEUROTRANSMISOR

Un neurotransmisor puede definirse como aquel producto liberado por la neurona como respuesta a un estado de excitabilidad determinado y que desarrolla una acción específica de temporalidad definida en la célula postsináptica una vez que interactúa con su receptor.

Es importante destacar que los principios básicos del proceso de la transmisión química que se han elucidado del estudio de la acetilcolina en neuronas de invertebrados y de la unión neuromuscular de vertebrados, son aplicables al sistema nervioso central y han dado origen a los siguientes criterios por los cuales una sustancia puede reconocerse como neurotransmisor (106):

a) El sustrato y las enzimas que la biosintetizan deben localizarse en la terminal sináptica.

b) Debe localizarse en las vesículas sinápticas y ser liberado en cantidades suficientes para ejercer su acción en la neurona receptora.

c) Durante la estimulación nerviosa debe detectarse en el fluido extracelular de la región de la sinapsis activada.

d) Su acción en la estructura postsináptica debe ser idéntica cuando se aplica directamente a la observada en condiciones fisiológicas normales.

e) Debe haber alguna enzima o mecanismo inactivante que se encargue de la eliminación del transmisor al concluir su acción.

f) Debe existir correlación de la acción de fármacos con el transmisor propuesto, tanto en condiciones fisiológicas, como en estudios "in vitro".

La transmisión sináptica ofrece grandes variaciones, sin embargo, es posible hacer algunas generalizaciones respecto a sus mecanismos en el sistema nervioso central de los mamíferos:

i) La liberación del transmisor resulta de una exocitosis dependiente de  $Ca^{++}$ .

ii) Cualquier transmisor puede producir respuestas diferentes en sitios distintos.

iii) Una respuesta bioquímica o iónica particular puede lograrse por diferentes transmisores en lugares distintos.

Cabe aclarar que debido al avance de las neurociencias, la lista de sustancias con una posibles función en la transmisión nerviosa se acrecenta constantemente. Al mismo tiempo, al estudiar varias de las sustancias postuladas como neurotransmisores, se ha encontrado que no siempre se almacenan en forma de vesículas y que su efecto varía con el sitio de acción. Esto significa que una sustancia que actúe como neurotransmisor en un sitio determinado, puede llegar a actuar como un neuromodulador en un lugar distinto. En este caso se encuentran muchos péptidos, por lo cual su papel neurotransmisor es muy controvertido.

## 2) NEUROTRANSMISORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Obedeciendo a los criterios anteriores se han postulado varias sustancias neurotransmisoras del sistema nervioso central que por su estructura química son agrupadas de la siguiente forma:

- a) Acetilcolina (Tabla 1)
- b) Aminas biogénicas: catecolaminas e indolaminas (Tabla 1)
- c) Aminoácidos (Tabla 1)
- d) Péptidos (Tabla 2)

### a) ACETILCOLINA

La acetilcolina es un neurotransmisor de bajo peso molecular conocido desde 1939. Su estudio sentó las bases para la definición de los criterios de una sustancia para ser considerada neurotransmisor y para el surgimiento de la teoría que habla del carácter cuantico de la liberación de los neurotransmisores (50). Esta teoría establece que el neurotransmisor se encuentra disponible en las vesículas presinápticas que en el sistema nervioso central pueden encontrarse en un número promedio de 10000 a 15000) y que es liberado en forma de paquetes o cuantos, cada uno equivalente al contenido de una vesícula. Probablemente durante el proceso que sigue a la estimulación, las vesículas se fusionan a la superficie interna de la membrana presináptica en sitios de liberación específicos y se abren vertiendo su contenido de manera todo o nada al espacio sináptico mediante exocitosis. Cada cuanto provoca un potencial sináptico miniatura que en conjunto forma un potencial sináptico normal, el número de cuantos secretado es directamente proporcional al  $Ca^{++}$  que entra a las terminales nerviosas.

La acetilcolina tiene la particularidad de no requerir de algún aminoácido como precursor, que es el caso de otros neurotransmisores de peso molecular pequeño. Su ruta de síntesis requiere de solo una reacción enzimática entre la acetil-CoA y colina mediante la colina acetil transferasa; llama la atención el hecho de que la colina no es sintetizada por el tejido nervioso sino que proviene principalmente de la dieta.

Este neurotransmisor desempeña su función en varias

regiones del sistema nervioso. A nivel central las células colinérgicas se concentran en el nucleus basalis y se proyectan ampliamente hacia la corteza cerebral, también las células de Betz de la corteza motora sintetizan acetilcolina y algunas neuronas motoras de la médula espinal por lo que este neurotransmisor es fundamental para la actividad muscular de los vertebrados. En el sistema nervioso autónomo la acetilcolina participa en las sinapsis de neuronas preganglionares y postganglionares parasimpáticas (92).

#### b) AMINAS BIOGENICAS

Las aminas biogénicas se dividen a su vez en un primer grupo que es el de las catecolaminas, el cual debe su nombre al grupo catecol de un anillo de benceno dihidroxilado en las posiciones 3 y 4. Las catecolaminas incluyen a la dopamina, norepinefrina y epinefrina, estos neurotransmisores se relacionan entre sí porque se originan a partir de tirosina para lo que se requiere el concurso de 5 enzimas. En principio, la tirosina hidroxilasa transforma la tirosina en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), ésta pierde el grupo carboxilo por medio de la carboxilasa de los aminoácidos aromáticos para producir dopamina y dióxido de carbono, que después se convierte en norepinefrina por la beta-hidroxilasa, por último la fenil-etanolamina-N-metiltransferasa añade un metilo a la norepinefrina resultando la epinefrina (44).

La dopamina es conocida desde 1957 y se localiza en el mesencéfalo. Del contenido total de dopamina, un 80% se encuentra en el cuerpo estriado. La principal ruta dopaminérgica cerebral se origina en la zona compacta de la sustancia nigra que inerva al núcleo caudado y al putamen del cuerpo estriado. La corteza frontal y del cíngulo, el septum, el nucleus accumbens y el tubérculo olfatorio, también reciben vías dopaminérgicas. Se ha comprobado que su liberación es inducida por impulsos nerviosos, por estimulación eléctrica y por la acción de ciertos fármacos. Este neurotransmisor tiene gran importancia por estar involucrado en enfermedades como el llamado "mal de Parkinson" y en diferentes tipos de esquizofrenias (92).

La norepinefrina fue identificada en 1939 y su distribución es amplia; abarca la formación reticular (la médula oblongada, el bulbo raquídeo, el puente y el mesencéfalo), dorsalmente se encuentra particularmente concentrada en el locus coeruleus que inerva a la médula espinal y al cerebro anterior, ventralmente se localiza en células que inervan el tallo cerebral y el hipotálamo, a nivel del sistema simpático también se ha detectado su presencia. Su función está implicada en la vasoconstricción, la contracción muscular, la dilatación de pupilas y la excitación de glándulas endócrinas. Por otra parte, actúa en la relajación del músculo liso y en el cerebro actúa en la vasodilatación (92).

La epinefrina lleva a cabo acciones similares a las de la norepinefrina, pues interviene en la regulación del ritmo cardíaco y la presión sanguínea (92).

El segundo grupo de las aminas biogénicas son las indolaminas, de las cuales forma parte la 5-hidroxitriptamina (5-HT) que es mejor conocida como serotonina. Se caracterizan por -

T A B L A # 1

Algunos neurotransmisores postulados del SNC , enzimas involucradas en su síntesis y mecanismos de inactivación -- correspondientes a cada grupo(92, 44).

AMINAS BIOGENICAS

Neurotransmisor	Enzima de Síntesis	Mecanismos de inactivación.
Acetilcolina	Colina Acetiltransferasa.	1) Degradación enzimática.
Dopamina	Tirosina Hidroxilasa.	1) Recaptura - principal--mente.
Norepinefrina	Dopamina-beta-hidroxilasa.	2) Difusión.
Epinefrina	Fenil-etanolamina-N-metiltransferasa.	3) Degradación metabólica.
Serotonina	Triptofano hidroxilasa.	
Histamina	Histidina descarboxilasa.	

AMINOACIDOS

GABA	Acido glutámico descarboxilasa.	
Glicina		1) Recaptura de alta afinidad hacia neuronas y células gliales.
Acido glutámico		
Acido aspártico.		

tener un grupo indol que es un anillo de 5 miembros que contiene hidrógeno y que se une a un anillo de benceno. Las concentraciones de serotonina en el sistema nervioso central de rata son muy variadas; en el hipotálamo, mesencéfalo y tallo cerebral las concentraciones son altas (0.98, 0.97 y 0.83  $\mu\text{g/g}$  de peso húmedo, respectivamente), moderadas en el la corteza cerebral, y en el hipocampo (aproximadamente 0.5  $\mu\text{g/g}$  de peso húmedo), mientras que en el cerebelo alcanzan niveles bajos (0.07  $\mu\text{g/g}$  de peso húmedo). La fuente principal de serotonina en el cerebro está en el núcleo del raphe medio y dorsal, en el puente y en el mesencéfalo (92).

La serotonina, se clasifica como un neurotransmisor excitatorio que predomina en terminales nerviosas, interviene en la regulación de la adenhipófisis, en el sueño, apreciación del dolor, termorregulación, control de la presión sanguínea, el apetito, la sed, la respiración y la memoria.

Las indolaminas también incluyen a la histamina que es un neurotransmisor proveniente de la histidina, regula entre otros procesos, la ingesta de agua, la liberación de vasopresina, la emesis, la termorregulación e interviene también en el control de la adenhipófisis y en la función cardiovascular.

#### c) AMINOACIDOS

Entre los aminoácidos, que en general se encuentran en las interneuronas, se reconocen algunos de tipo inhibitorio como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y glicina los cuales aumentan la permeabilidad de la membrana al  $\text{Cl}^-$ . del primero hablaremos más ampliamente en el capítulo siguiente. La glicina al parecer es liberada por interneuronas inhibitorias de la médula espinal y del bulbo raquídeo.

Por otro lado, se conocen aminoácidos excitadores de los que sobresalen el ácido glutámico y el ácido aspártico que excitan poderosamente aumentando la permeabilidad de la membrana al  $\text{Na}^+$  en un grado comparable al de la acetilcolina. Ambos aminoácidos excitan prácticamente todas las neuronas con las que establecen contacto, siendo aún más potente el ácido glutámico.

Otros aminoácidos que se postulan como candidatos a neurotransmisores pero que todavía no están lo suficientemente estudiados son: la taurina, que tiene una fuerte acción inhibitoria en la médula, el tallo y la corteza cerebral; también la serina, prolina, el ácido N-acetilaspártico, la alfa y beta-alanina y el ácido cisteinsulfínico (92).

#### d) PEPTIDOS

Actualmente se conocen más de 20 posibles péptidos candidatos a ser considerados neurotransmisores los que se encuentran distribuidos en pequeñas cantidades, en neuronas de todo el cerebro; a diferencia de otros neurotransmisores, se piensa que en el caso de los péptidos no ocurre un mecanismo de recaptura sino que la inactivación corresponde a una degradación enzimática. Entre estos neuropéptidos se encuentran: la substancia P que es excitatoria, modula la liberación de la somatostatina, transporta señales del dolor y está involucrada en



T A B L A # 2

Péptidos importantes aislados del LCR y sus Funciones Principales en el Sistema Nervioso (94)

Neuropéptidos	Funciones
Substancia P	Produce respuestas excitadoras de larga duración. Es mediador de señales del dolor.
Neurotensina	Neurotransmisor inhibitorio, modula la liberación de algunas hormonas.
Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH)	Antagoniza al etanol y barbitúricos, libera la tirotropina y la hormona del crecimiento.
Somatostatina (SRIF)	Neurotransmisor inhibidor o -- excitador. Bloquea liberación de la hormona del crecimiento.
Angiotensina	Interviene en el balance electrolítico y probablemente, en el aprendizaje y memoria.
Calcitonina.	Modulador del metabolismo de $Ca^{2+}$ . Afecta posiblemente el apetito y actividad motora. Analgésico.
Endorfinas:	Neurotransmisores inhibidores
Met-Encefalina	Analgésicos
Leu-Encefalina	Deprime actividad motora.
Alfa-Endorfina	Controla la liberación de --- la hormona pituitaria.
Carnosina	Mediador de señales olfatorias.
Vasopresina y Oxitocina	Aún no son bien conocidas sus funciones. La vasopresina puede facilitar el aprendizaje.

la enfermedad de Huntington. Otros posibles neurotransmisores son la neurotensina que es de tipo inhibitorio e interviene en la modulación de la liberación de algunas hormonas como la del crecimiento y la prolactina, también están involucrados en eventos de la transmisión sináptica la hormona liberadora de tirotricina, la angiotensina, la bradiquinina, la bombesina, la oxitocina, la vasopresina, la carnosina, la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona estimulante de los melanocitos (MSH), el factor inhibidor de los melanocitos (MIF) y algunos opiáceos endógenos como las encefalinas y las endorfinas (94).

### 3) MECANISMO DE ACCION

El mecanismo de acción más comprendido actualmente para los neurotransmisores en general, menciona la unión a un receptor específico que provoca un cambio en las permeabilidades transmembranales para uno o más iones que se traduce a su vez, en un cambio de potencial de la membrana postsináptica. En reposo, el potencial de la membrana definido por la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz considera los iones de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . En estas condiciones, la permeabilidad del  $\text{K}^+$  es mayor que la de los otros iones lo que explica que el potencial de equilibrio en reposo, sea muy seroximado a la constante de equilibrio electroquímico para el  $\text{K}^+$ . Después del estímulo, el potencial de reposo es desplazado hacia las constantes de equilibrio correspondientes a los iones para los que un neurotransmisor determina un aumento de la permeabilidad.

Otro mecanismo implica la acción de segundos mensajeros cuya acción es más prolongada.

De acuerdo a los mecanismos de acción mencionados, pueden distinguirse dos tipos de neurotransmisores (44):

- a) Ionotróficos.- son aquellos cuya función principal es provocar cambios de conductancia con lo que se abren canales a iones específicos a través de la membrana postsináptica.- Por ej: Acetilcolina y los aminoácidos.
- b) Metabotróficos.- éstos producen cambios metabólicos de mayor duración en las células postsinápticas, requieren de un segundo mensajero por lo que su acción es más lenta, estimulan también la síntesis de nucleótidos cíclicos . Ej: las aminas.

En general, debido a que la constante de equilibrio electroquímico para el  $\text{K}^+$  es más negativa que el potencial de membrana en reposo, un aumento en la permeabilidad de  $\text{K}^+$  o de  $\text{Cl}^-$  es hiperpolarizante y un aumento en la permeabilidad de  $\text{Na}^+$  es depolarizante. Por otra parte, en función de la respuesta que provocan en la célula postsináptica los neurotransmisores pueden ser (44):

- a) Excitadores.- son aquellos que propician la generación de impulsos aumentando la probabilidad de disparo de la célula postsináptica, en este grupo se ubican la acetilcolina, la

serina, la norepinefrina.

b) Inhibidores.-- estos por el contrario, provocan un bloqueo en la generación de impulsos por la hiperpolarización de la membrana, en este grupo se encuentran el GABA y la glicina.

#### 4) RECEPTORES

##### a) CARACTERIZACION Y CLASIFICACION

Hasta ahora se han definido los mecanismos que conforman los eventos presinápticos de la transmisión química, y surge entonces la pregunta de cómo un neurotransmisor puede evocar una respuesta inhibitoria en algunas sinapsis y excitatorias en otras, o incluso ambas.

Actualmente es claro que tales efectos se logran mediante la interacción de los neurotransmisores con receptores presentes en la porción postsináptica, que son los que determinan en primera instancia el caracter excitador o inhibitor de una sinapsis, no el neurotransmisor por sí mismo (44, 1).

En 1900, Ehrlich introdujo la idea de receptor para explicar la acción selectiva de toxinas y fármacos y la especificidad de las reacciones inmunológicas (25). Los receptores fueron concebidos inicialmente como entidades responsables de la respuesta al neurotransmisor.

Molecularmente, los receptores son complejos proteicos embebidos y orientados hacia el lado externo de la membrana postsináptica, poseen un sitio activo de unión al neurotransmisor que puede localizarse con el uso de técnicas autorradiograficas. De acuerdo al tipo de cambio que producen en la célula postsináptica, se pueden distinguir dos tipos de receptores (44):

i) Receptores mediadores de cambios en la conductancia de la membrana, también llamados ionofóricos, como los receptores de acetilcolina y GABA.

ii) Receptores mediadores de cambios en la maquinaria metabólica de la célula postsináptica, por ejemplo el receptor beta-adrenérgico.

##### 1) RECEPTORES IONOFORICOS

El caso más estudiado entre los receptores ionofóricos es el de acetilcolina donde se asume que el complejo receptor media dos funciones: una es la unión del transmisor a un sitio de unión específico y la otra involucra la formación de una estructura tubular que atraviesa la bicapa lipídica (ionóforo) que causa un cambio de permeabilidad y permite el flujo iónico. En la unidad funcional llamada complejo-receptor, el receptor y el ionóforo están estrechamente relacionados de tal manera que la unión del neurotransmisor induce un cambio de conformación primario en el receptor y después en el ionóforo, resultando en la apertura de una compuerta que permite que los iones fluyan a través de este último. Este modelo propone que varios receptores específicos

para un neurotransmisor, pueden estar asociados con el mismo ionotrofo (92).

## ii) RECEPTORES MEDIADORES DE CAMBIOS METABOLICOS

Esta segunda clase involucra la formación de segundos mensajeros intracelulares que pueden ser AMPc, GMPc o ciertos lípidos que activan cinasas que sean dependientes de alguna de estas moléculas, capaces de cambiar la maquinaria metabólica de la célula postsináptica, a través de una serie de reacciones. Se ha observado que la dopamina, norepinefrina, serotonina, histamina, octapamina y las encefalinas, activan a la enzima adenilato ciclasa en el sistema nervioso central. El GMPc puede ser activado por la histamina y la norepinefrina (24).

El mecanismo desarrollado por estos receptores, vía segundos mensajeros, implica la introducción de un grupo fosfato que altere y modifique la función de una enzima, o de una proteína reguladora. Estos cambios ocurren a distintos niveles, es decir, que la fosforilación disminuye la actividad de una enzima por disminuir la afinidad de ésta por su sustrato o por cambiar su localización dentro de la célula. En cambio, la actividad puede estimularse si el nuevo lugar resulta más eficiente y lo protege de probables inhibidores o si aumenta la afinidad por el sustrato (44).

## b) VELOCIDAD Y DURACION DE LA ACCION DE LOS RECEPTORES

Respecto a la velocidad de acción de los receptores es importante señalar que esto depende de varias características moleculares, entre otras destacan el tiempo de vida del mensajero, así como su concentración efectiva. Una sustancia que es activa a bajas concentraciones y es removida lentamente del espacio sináptico, tendrá un período de acción mayor que aquellas sustancias que requieren altas concentraciones para ser activas y que sean degradadas rápidamente; los neurotransmisores de alto y bajo peso molecular pertenecen a cada una de estas categorías respectivamente (44).

Los receptores que producen cambios bioquímicos en la célula postsináptica, son típicamente lentos a causa de los pasos involucrados para ello. En las neuronas, los cambios que dependen de la presencia de altas concentraciones de un segundo mensajero, generalmente son de duración moderada, aunque éstos son mucho más prolongados que los inducidos por receptores ionotrópicos, solo duran minutos ya que existen enzimas intracelulares que inactivan rápidamente a los segundos mensajeros, además de fosfatasas que remueven el grupo fosfato de las proteínas. Parte de la importancia de los eventos participantes en la mediación de cambios lentos radica en que estas actividades pueden ser alteraciones tróficas de larga duración implicadas a su vez, en la plasticidad sináptica y algunos procesos de la memoria.

En conclusión, los receptores se caracterizan como rápidos, por ejemplo los de tipo ionotrópico que emplean decenas de milisegundos para efectuar su acción; y lentos los que requieren lapsos del orden de cientos de milisegundos como los metabotrópicos (44).

## 5) NEUROMODULACION

### A) DEFINICION

En 1967, Florey denominó sustancias moduladoras a cualquier compuesto de origen celular no sináptico que afectase la excitabilidad de las células nerviosas lo que representaría un enlace de los mecanismos regulatorios que gobiernan el funcionamiento del sistema nervioso (27). El mismo Florey distinguió entre la naturaleza de la acción de un transmisor y la de una hormona. La primera se localiza típicamente y está limitada a la región subsináptica, es decir, no involucra eventos intracelulares. En cambio, las acciones hormonales no se limitan a la región sináptica, su efecto es prolongado y puede incluir eventos intracelulares. Si bien, Florey limitó su definición de neuromoduladores a sustancias originadas en la sangre, en forma natural se ha ampliado esta distinción para incluir sustancias liberadas de las terminales nerviosas, pero que funcionan más como hormonas que como transmisores clásicos. Ahora, las sustancias neuromoduladoras no se encuentran ya restringidas a un origen no sináptico e incluyen a las catecolaminas, norepinefrina, dopamina, serotonina y numerosos péptidos (1).

En la actualidad, aún cuando se comprende que la modulación implica una gama muy diversa de mecanismos por los cuales una sustancia determinada afecta la respuesta o liberación de un neurotransmisor, no se ha llegado a un acuerdo respecto a su definición. Sin embargo, se reconoce que gran parte de la importancia de los eventos modulatorios, radica en que proporcionan al sistema nervioso mayores potencialidades y adaptabilidad a cambios a largo plazo, tanto internos como medio ambientales (1).

Es importante considerar algunas generalizaciones acerca de la acción de los transmisores, que contribuyen a distinguir las funciones que desempeñan los neuromoduladores (30):

- i) Una sustancia neurotransmisora puede inducir respuestas diferentes en neuronas distintas o en una misma neurona.
- ii) En función del tipo de actividad que realice, una misma sustancia puede actuar como neurotransmisor o como neuromodulador.
- iii) El papel de los péptidos en el sistema nervioso es muy controvertido, pero aunque se les considera generalmente neuromoduladores, también pueden funcionar como neurotransmisores y generar respuestas por incremento de conductancias iónicas.
- iv) El término neurohormona indica sólo que el transmisor es liberado hacia la sangre o el espacio extracelular, y no indica qué respuesta es generada sobre la activación del receptor.

En forma general, puede decirse que la modulación sináptica es un cambio observado en la función sináptica, que involucra una serie de mecanismos que alteran las conductancias acopladas al

receptor sináptico, sin activación directa de tales conductancias (90, 8).

De la Breve definición anterior, surge la diferenciación de los términos transmisión y modulación sinápticas. El primero refiere la transmisión de una señal de una célula a otra, mediada por transmisión eléctrica, o por un neurotransmisor reconocido por receptores postsinápticos, en contraste, la modulación representa un fenómeno observado que no incluye a un mecanismo específico (90).

Así mismo, se pueden establecer diferencias entre las acciones de neurotransmisores y neuromoduladores. A diferencia de los neurotransmisores rápidos, la mayoría de los neuromoduladores son de acción lenta, de larga duración, y tienen un rango de acción amplio llevado a cabo de maneras muy complejas (1). Los transmisores ionofóricos abren canales en la membrana postsináptica que permiten el cambio de potencial por el paso de determinados iones, mientras que los neuromoduladores actúan metabólicamente en forma análoga a las hormonas, por activación de un segundo mensajero en la célula postsináptica. Los receptores a neuromoduladores pueden localizarse en cualquier parte de la neurona, por lo tanto, sus acciones son muy diversas. Probablemente, los neuromoduladores que interactúan con receptores presinápticos, modulan la liberación del transmisor, por alteración del flujo de  $Ca^{++}$  (1).

En resumen, la modulación puede manifestarse por algunos de los siguientes efectos: alteración de la frecuencia de descarga endógena y/o configuración de potenciales de acción durante un periodo de tiempo relativamente largo, cambio de la respuesta de otros transmisores durante un tiempo relativamente prolongado y sin afectar la propia. El efecto también puede ser combinado, de manera que sea mayor que la suma de efectos de las dos sustancias por separado. Por último, la alteración de la respuesta a otros neurotransmisores podría ser mayor que aquella posiblemente provocada por acciones individuales sobre el potencial o la resistencia de membrana, pero sin alteración simultánea de respuestas de otras sustancias sobre la misma célula (90).

## b) MECANISMOS DE NEUROMODULACION

Una vez establecido que el modulador incide en la acción del neurotransmisor, es fundamental establecer que esto puede ocurrir por alguno de los siguientes mecanismos (85):

A nivel presináptico:

- i) La regulación de la actividad de la bomba  $Na^{+} - K^{+}$ .
- ii) Síntesis o almacenamiento de neurotransmisores y alteración de los mecanismos de neurosecreción.
- iii) Control del potencial de la membrana, por un cambio de permeabilidad al  $Ca^{++}$ , y por lo tanto en la concentración de  $Ca^{++}$  libre en la terminal.

iv) La concentración de mensajeros intrínsecos como el AMPc y el GMPc (a nivel pre y postsináptico).

A nivel postsináptico las alteraciones pueden ser:

i) Por alteración de la accesibilidad del receptor, por un cambio en el número local de los receptores o un cambio de afinidad de éste por su neurotransmisor.

ii) Por alteración de los sistemas de decodificación de la información.

## CAPITULO III

### GABA Y TRANSMISION GABAERGICA

#### 1) GABA COMO NEUROTRANSMISOR DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Entre los aminoácidos postulados como neurotransmisores, se encuentran la glicina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA), éste último ha recibido gran atención a partir de 1950, año en que fue descubierta su presencia en el cerebro por Roberts y Awapara (81, 5) de manera simultánea aunque independientemente. Inicialmente el GABA despertó interés por encontrarse en gran cantidad en el cerebro y en cantidades mínimas en otros órganos.

En los cincuenta se realizaron estudios neurofisiológicos del papel del GABA en el acodil (*Procambarus* sp.) que sugerían ya su carácter inhibitorio (101). Posteriormente se estableció una correlación entre algunos estados patológicos de hiperexcitabilidad y convulsiones en ratas, y una disminución del GABA cerebral, hecho en el cual radica gran parte del interés por este neurotransmisor.

Actualmente se reconoce al GABA como el neurotransmisor de más amplia distribución en el sistema nervioso central de los mamíferos tanto desde el punto de vista anatómico como fisiológico, se calcula una concentración total en el cerebro de aproximadamente 2  $\mu$ moles/g de tejido lo que equivale por lo menos a dos órdenes de magnitud por encima de la concentración de otros neurotransmisores importantes como la acetilcolina o las catecolaminas (101).

El GABA cumple con los criterios especificados para ser considerado neurotransmisor; a nivel presináptico destaca la demostración "in vivo" e "in vitro" de una liberación de GABA dependiente de  $Ca^{++}$  por estimulación de fibras aferentes o por despolarización inducida por altas concentraciones de  $K^{+}$ . No obstante, recientemente se ha comprobado que en rebanadas y sinaptosomas de rata y ratón, la liberación de GABA provocada por despolarización, representa un fenómeno que puede ser parcialmente dependiente de  $Ca^{++}$  (96, 20, 42, 48, 62, 102). Además se considera como evidencia de su función neurotransmisora, la existencia de un proceso de recaptación involucrado en la eliminación del neurotransmisor a nivel del espacio sináptico, que depende de  $Na^{+}$  y  $Cl^{-}$ . Este sistema es caracterizado por dos constantes de transporte, una de alta afinidad con  $K_m$  del orden de 10-40  $\mu$ M y de baja afinidad con  $K_m$  de aproximadamente 300  $\mu$ M (101).

Este neurotransmisor se ha caracterizado como de tipo inhibitorio por excelencia, considerando como evidencia de ello, su efecto hiperpolarizante dependiente de la entrada de  $Cl^{-}$ . En el sistema nervioso central, en la médula espinal, una clase importante de interneuronas inhibitorias son GABAérgicas; en el cerebro está muy concentrado y se piensa que sirve como transmisor en las células granulares del bulbo olfatorio, en células amacrinias de la retina, en células de Purkinje del cerebelo y en las células en cesta de cerebelo e hipocampo. De hecho, se considera que mediante su acción inhibitoria en muchas vías neuronales, y su intervención en la regulación de la



vias neuronales, y su intervencion en la regulacion de la actividad electrica, es que el GABA modula ciertas funciones. Algunas de estas funciones son la actividad motora, la secrecion de hormonas hipofisarias y el equilibrio emocional e intelectual (101).

Sin embargo, se ha detectado en células piramidales del hipocampo, que el GABA provoca respuestas inhibitorias en unas dendritas y excitatorias en otras (92). Recientemente, se ha determinado que altas concentraciones de GABA hiperpolarizan las células piramidales del hipocampo de cobayo y que dicho efecto es estimulado con bajas concentraciones de  $Cl^-$  y bloqueado por picrotoxina, pero no es afectado por cambios de la concentración externa de  $K^+$ . Estas observaciones sugieren que esta acción de GABA en hipocampo, puede involucrar una activación de la conductancia de  $K^+$  (40).

Por otra parte, en relación a la forma en que el GABA se encuentra disponible en las terminales sinápticas, se discuten dos posibilidades. En 1972, la observación de los potenciales excitatorios e inhibitorios, parecía evidenciar la presencia de componentes cuantales en la unión neuromuscular (56). A su vez, esto sugirió que el GABA como otros neurotransmisores inhibitorios, podría estar almacenado en vesículas sinápticas. Los primeros intentos por demostrar el origen vesicular del GABA, no resultaron convincentes por posibles artefactos de las técnicas utilizadas (64, 56, 57).

Hacia 1972, Rassin (80) realizó experimentos provocando choque osmótico en sinaptosomas para liberar los contenidos, que después fueron fraccionados y cuantificados. Sus resultados sugirieron que las pozas de GABA eran bastante diferentes de las de acetilcolina. Probablemente sus observaciones se deban a que los aminoácidos unidos a vesículas, no son sensibles a choque osmótico.

A la fecha, el problema del sitio de almacenamiento del GABA aún no se resuelve debido a que bastantes evidencias, señalan más bien, un origen citoplásmico que un origen vesicular para aminoácidos liberados de sinaptosomas de mamíferos (23).

## 2) SINTESIS Y METABOLISMO DE GABA

Entre varias rutas conocidas para la síntesis de GABA, la más importante, es la que se lleva cabo en el sistema nervioso central (Fig. 4). Esta vía parte del ácido glutámico como precursor directo, comprende un solo paso que es mediado por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (AGD) cuyo peso molecular es de 85000 y se encuentra disponible en el citoplasma de células exclusivamente neuronales, es decir, que la porción glial es incapaz de producir GABA (92).

Una vez que el ácido glutámico es descarboxilado por la AGD para producir GABA, su degradación comienza con una transaminación que requiere de la GABA transaminasa (GABA-T), presente en células nerviosas y gliales. Durante esta reacción se produce semialdehído succínico que es oxidado por la semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADH) produciendo ácido succínico que se reintegra al ciclo de Krebs. El alfa-cetoglutarato actúa como

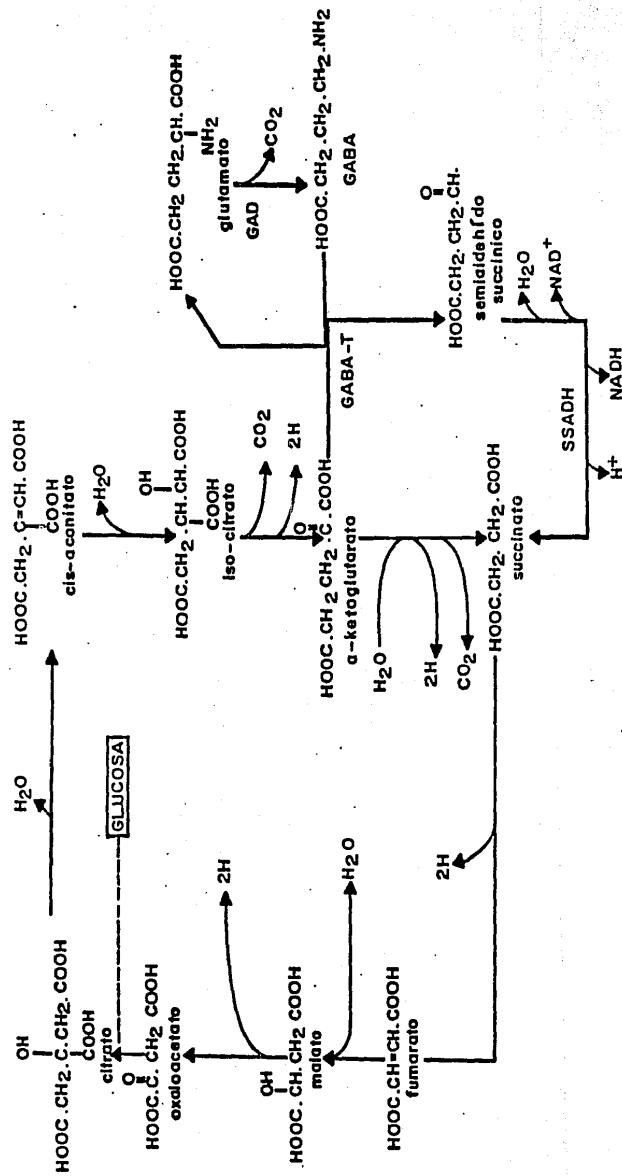


FIG. 4. Relación del ciclo de krebs con el glutamato y la ruta de síntesis de GABA (GABA shunt) indicada con líneas gruesas. Tomado de Davidson, N. (22).

aceptor del grupo amino transferido por la GABA-T lo que regenera ácido glutámico para reiniciar el ciclo. El rendimiento energético de esta ruta en el cerebro es equivalente a 3 ATP más un GTP (92).

Tanto la AGD como la GABA-T requieren fosfato de piridoxal como cofactor, sin embargo se conoce para el caso de la AGD una forma de actividad que depende sólo de la coenzima firmemente unida a la apoenzima. También la AGD posee la particularidad de realizar su función en ausencia de oxígeno lo que determina un aumento postmortem de la concentración de GABA en el cerebro. Cabe mencionar que aun cuando la AGD es citoplásmica, en presencia de  $Ca^{++}$  y altas concentraciones de  $K^+$ , es capaz de unirse a estructuras membranales (92).

Para el caso de la glía que carece de la AGD, el glutamato es transformado a glutamina por la glutamina sintetasa presente en el citoplasma, de donde pasa a las terminales nerviosas, ahí la glutaminasa regenera ácido glutámico para una poza que se descarboxila para producir GABA (Fig. 5).

A nivel periférico se ha detectado actividad de la AGD en por lo menos 20 tejidos diferentes y ha sido significativa en riñón, corazón, páncreas, plexo mientérico y el oviducto de rata (26). Posiblemente, según ensayos bioquímicos, esta enzima (AGD) sea un tipo distinto a la presente en el cerebro, aunque con propiedades que parecen ser idénticas para ambas.

Una ruta alternativa importante de la síntesis de GABA en algunos órganos periféricos, tiene como precursor a la putrescina. El primer paso de esta vía incluye la conversión de putrescina (1-4-diaminobutano) a GABA-aldehído (aldehído-4-aminobutílico) que a su vez es transformado a GABA por una aldehído deshidrogenasa. En el oviducto de rata pueden sintetizarse cantidades de GABA a partir de la putrescina, comparables a las obtenidas del glutamato. La degradación del GABA ocurre también a través de la GABA-T (26).

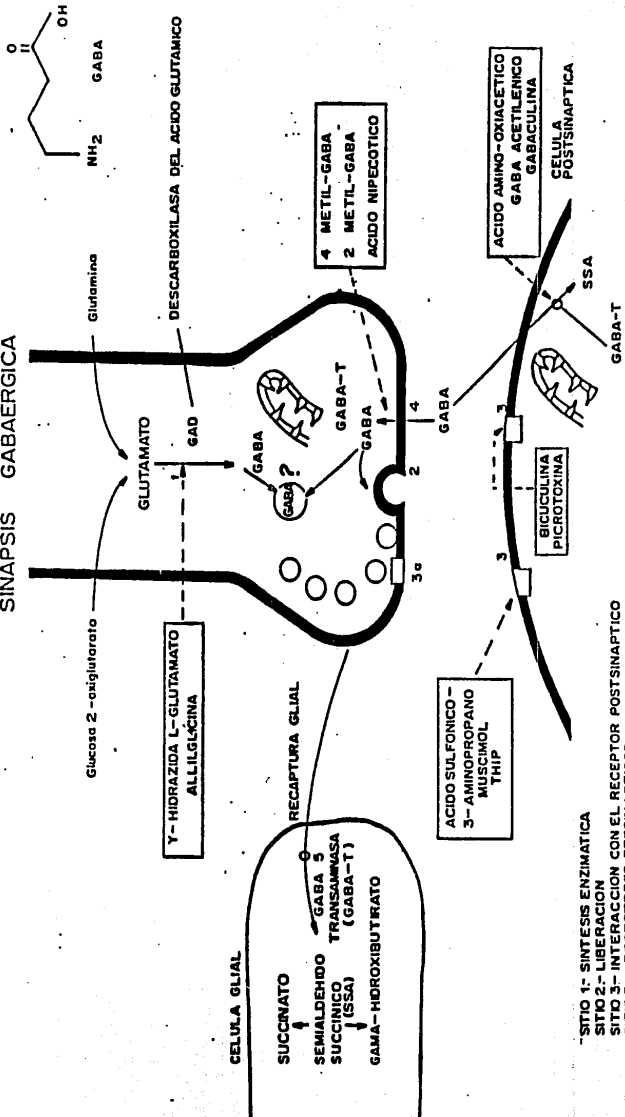
### 3) DROGAS QUE INTERACTUAN CON EL GABA

El GABA representa un neurotransmisor de gran interés con respecto a las alteraciones neurológicas y mentales en que al parecer se encuentra involucrado. Para el esclarecimiento de los mecanismos intrínsecos de la transmisión GABAérgica y los relacionados con dichas alteraciones, ha sido fundamental el uso de múltiples fármacos o drogas como los que se mencionan en la Tabla 3.

Actualmente se reconocen cuatro niveles principales a los cuales puede afectar una droga a un neurotransmisor (102):

- i) Puede afectar al receptor y bloquear por lo tanto todas las respuestas a un transmisor determinado.
- ii) Puede incidir su acción en el ionóforo bloqueando entonces todas las respuestas iónicas similares, sin considerar las del transmisor que las genera.
- iii) El tercer efecto sería combinado entre el receptor y el ionóforo.

# SINAPSIS GABAERGICA



- SITIO 1- SINTESIS ENZIMATICA
- SITIO 2- LIBERACION
- SITIO 3- INTERACCION CON EL RECEPTOR POSTSINAPTICO
- SITIO 3a- RECEPTORES PRESINAPTICOS
- SITIO 4- RECAPTURA NEURONAL
- SITIO 5- METABOLISMO POR GABA-T

FIG. 5. Esquema de la sinapsis GABAérgica en el que se indican los sitios probables de la acción de drogas.

Sitio 1: La síntesis enzimática. La AGD es inhibida por varias hidrazinas. Estos agentes parecen actuar primariamente como antagonistas del piridoxal, por lo tanto, son inhibidores inespecíficos. El L-glutamato-gamma-hidrazida y aliglicina son más específicos de la AGD-I, pero sus efectos no son completamente específicos.

Sitio 2: Liberación: Aún no se han identificado inhibidores de la liberación de GABA.

Sitio 3: Interacción con el receptor postsináptico; la bicuculina y picrotoxina bloquean la acción de GABA en receptores postsinápticos.

Sitio 4: Recaptura: al parecer el GABA es transportado activamente hacia la presinapsis por un mecanismo dependiente de  $\text{Na}^+$ . El 4-metil-GABA y el 2-hidroxi-GABA inhiben este mecanismo, pero estos agentes no son muy específicos en sus efectos inhibitorios. Modificado de Cooper, J.R. y Col. (19).

- iv) Un fármaco puede ejercer también acciones de competencia con el neurotransmisor por el sitio receptor.

De esta serie de fármacos, por un lado se conocen a los compuestos agonistas que son aquellos que imitan la acción del neurotransmisor, es decir, en este caso, simulan los efectos hiperpolarizantes del GABA e incluso pueden competir con éste por el sitio receptor. En este grupo se ubica al muscimol, que es una droga aislada del basidiomiceto Amanita muscaria cuya acción agonista es muy potente a nivel de receptores de la médula espinal sensibles a bicuculina. El uso de compuestos como el muscimol, ha permitido el mapeo de los sitios receptores a GABA. Recientemente se ha identificado que el muscimol, isoguvacina y el ácido 3-aminopropansulfónico (3-APS), son agonistas del receptor denominado GABA-A (93). Así mismo, el baclofeno (beta-paraclorofenil-GABA) actúa como agonista del receptor GABA-B, el cual no es antagonizado por bicuculina (8, 9, 38, 10, 93, 11, 12, 43, 49).

Por otra parte, destacan los compuestos antagonistas que como su nombre lo indica, su acción es inversa a la del neurotransmisor como ocurre con la picrotoxina y la bicuculina que impedirían activamente la unión de compuestos del tipo del muscimol.

De los inhibidores enzimáticos, puede citarse por ejemplo, al ácido aminooxiacético que es un compuesto integrante del grupo de atrapadores del carbonilo que inhibe a la GABA-T (y en menor grado a la AGD) lo que induce un aumento del GABA, que provoca un efecto sedativo. El sodio-n-dipropilacetato es el inhibidor de la GABA-T más útil, sin embargo, también puede interactuar con sistemas de aminoácidos excitadores.

Otras drogas importantes, son los agentes que tienden a inhibir más a la AGD que a la GABA-T induciendo convulsiones por disminución de la actividad del GABA. Ejemplos de este grupo son la glicicina y el ácido 3-mercaptopropiónico.

Entre los inhibidores de la captura de GABA están el ácido nipecótico que afecta a la porción neuronal (54, 13, 55, 97) y probablemente un tanto a la glial. La beta-alanina actúa como inhibidor selectivo del transporte de alta afinidad del GABA en las células gliales, unos 200 veces más poderosamente que sobre el transporte de células neuronales (89, 92).

Otros compuestos que interfieren con la acción del GABA son los inhibidores de la bomba de captura los cuales estimulan y prolongan la acción inhibitoria del GABA, en este grupo sobresalen ciertos análogos del GABA como el 2-hidroxi-2-cloro-GABA y el 4-metil-GABA (92).

Adicionalmente se conocen otros compuestos cuyo efecto no es específico para GABA. En este caso están la toxina tetánica que actúa principalmente inhibiendo la liberación, no sólo de GABA, sino también de glicina. También algunos digitalícos como la ouabaina inciden directamente sobre la ATP-asa y producen una despolarización de las células (3).

T A B L A # 3

Diferentes drogas que alteran eventos pre y postsinápticos  
de la transmisión GABAérgica (92)

Agonistas del receptor GABA- A	Muscimol, homotaurina, THIP, isoguvacina, 3-APS.
Agonistas del receptor GABA-B	Baclofeno.
Antagonistas del receptor GABA-A	Picrotoxina y bicuculina.
Inhibidores de la AGD.	Acido aminoxiacético, ali glicina, ac. 3-mercpto-- propiónico.
Inhibidores de la GABA-T	Acido aminoxiacético, so- dio-n-dipropilacetato, -- GABAculina.
Inhibidores de la captura neuronal de GABA	Acido nipecótico, ác.cis-3 aminociclo hexanocarboxíli co.
Inhibidor de la captura glial de GABA	Beta-alanina.
Inhibidor de la libera ción presináptica (no es- pecífico para GABA)	Toxina tetánica.
Inhibidor de la ATP-asa	Ouabaína.

#### 4) RECEPTORES A GABA

Los receptores típicos de GABA corresponden a los llamados ionotóxicos por inducir cambios de permeabilidad en la membrana. Se han realizado estudios de las propiedades farmacológicas de los receptores para GABA tanto en invertebrados como en vertebrados, mostrando ser esencialmente diferentes.

Hasta finales de los setentas, se había caracterizado un receptor de GABA compuesto de varias subunidades y con un peso molecular de entre 200000 y 300000. Su distribución en el cerebro y médula espinal es bastante amplia. Se ha identificado que este receptor tiene sitios de unión distintos a los de GABA, que permiten la unión de otros ligandos (Fig. 4). Se han determinado 3 ligandos que son: el GABA, las benzodiazepinas y los barbitúricos, los cuales muestran una interacción de tipo alostérico, por ejemplo, cuando el GABA está unido al receptor, una benzodiazepina o un barbitúrico se une más firmemente (44). Además del sitio al que se une el neurotransmisor, existe otro sitio que sirve como canal selectivo para Cl<sup>-</sup> cuya apertura es regulada por algunas subunidades del mismo receptor.

Actualmente, se reconocen en los mamíferos, 2 tipos de receptores a GABA en tejidos cerebrales y periféricos, ambos capaces de deprimir la transmisión excitatoria (38, 10, 11, 12). Sus diferencias son establecidas básicamente a través de la potencia de compuestos agonistas.

Uno de ellos es el receptor GABA-A que es sensible a bicuculina y en el cual, el muscimol, isoguvacina y 3-APS tienen una acción poderosa. Una respuesta exclusiva del receptor GABA-A es el cambio de conductancia o del potencial de membrana, por la apertura de canales de Cl<sup>-</sup>. Al parecer, este primer receptor de GABA sería el que anteriormente había sido descrito como único receptor.

El segundo receptor es el GABA-B que es estimulado por baclofeno, en especial por el estereoisómero (-) y no es antagonizado por bicuculina (49). Esta observación es consistente a su vez, con evidencias recientes para 2 acciones diferentes del GABA insensibles a bicuculina, en el área del fascia dentata en rebanadas de hipocampo de rata, sólo una de las cuales fue alterada por baclofeno (11). Algunas evidencias sugieren que la respuesta del baclofeno es debida a un aumento en la conductancia de K<sup>+</sup>, pues utilizando varios agentes bloqueadores de canales de K<sup>+</sup> (por ejemplo, el bario), se redujo notablemente la respuesta (43).



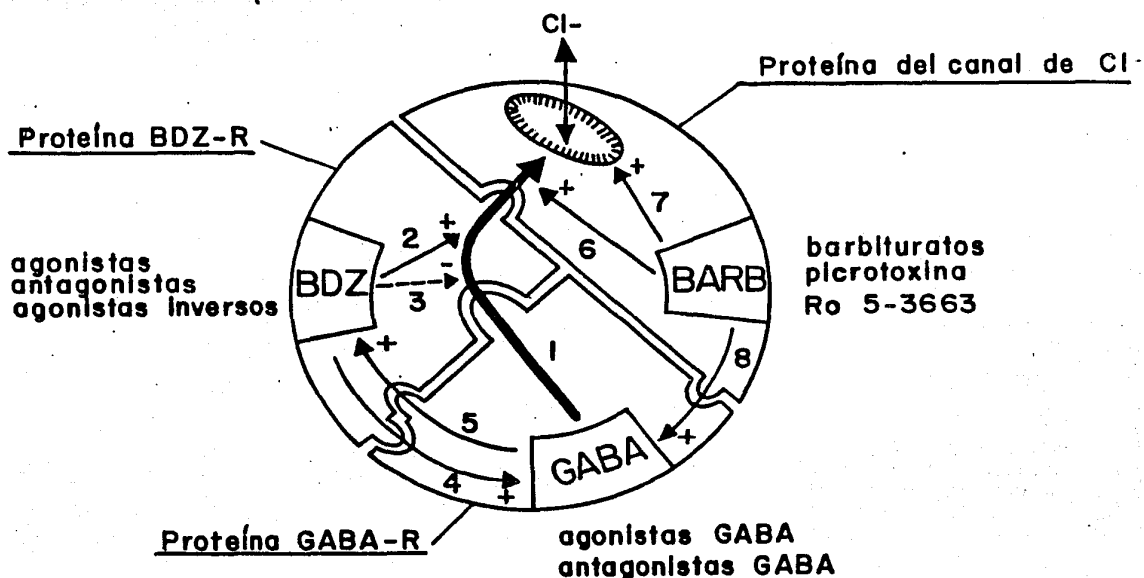


FIG. 6. Modelo del complejo receptor GABA-benzodiazepinas-canal de Cl<sup>-</sup> o receptor GABA-A. Cada proteína tiene un sitio de unión para benzodiazepinas, GABA y barbitúricos, respectivamente. La activación del receptor a GABA resulta en la apertura del canal de Cl<sup>-</sup>; en este proceso se propone al receptor de benzodiazepinas como unidad acopladora (1). Los agonistas de benzodiazepinas estimulan (2) y los agonistas inversos reducen la función acopladora. Tanto el receptor de GABA como el de benzodiazepinas se afectan mutuamente; los agonistas de benzodiazepinas aumentan la afinidad del receptor a GABA (4), mientras que los agonistas de GABA aumentan la unión de agonistas de benzodiazepinas (5). Por otra parte, los barbitúricos estimulan el proceso de acoplamiento (1) cerca a o en el canal de Cl<sup>-</sup> (6) y, en altas concentraciones, abre directamente el canal (7); también parece estimular la afinidad del receptor a GABA (8). Modelo propuesto por Polc, P. y col. (78).

## CAPITULO IV

### ANTECEDENTES Y CARACTERIZACION DEL ACIDO PIPECOLICO

#### 1) ANTECEDENTES DEL ACIDO PIPECOLICO

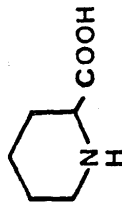
El ácido pipecolico (AP) junto con la prolina e hidroxiprolina, conforman el grupo de los únicos iminoácidos, también llamados aminoácidos secundarios, que hasta ahora se han encontrado involucrados en funciones del cerebro. Es importante destacar las semejanzas estructurales entre el AP y otros compuestos identificados en el sistema nervioso o relacionados con él (Fig. 7). El AP fue aislado e identificado primeramente en algunos vegetales (109, 67). Ahora se sabe que su distribución en el reino vegetal es amplia y que actúa como precursor de algunos alcaloides como la nicotina y la anabasina. Dentro del reino animal se ha caracterizado fundamentalmente entre los mamíferos y ha adquirido importancia a partir de 1953 en que se identificó en la rata como producto del metabolismo de lisina "in vivo" (83).

Este iminoácido ha atraído el interés por diferentes razones: por un lado representa el metabolito principal de la degradación de lisina "in vitro" e "in vivo" que se lleva a cabo en el sistema nervioso central de vertebrados (30, 16, 18). Sin embargo, en otros órganos como el riñón y el hígado donde también se ha detectado su presencia, el metabolito intermedio de la lisina es la sacaropina (84, 26, 39). Los niveles de AP se cuantificaron "in vitro" por primera vez, en el cerebro de ratón y otros órganos, en 1977 (87). En la rata se identificaron por cromatografía de líquidos, mayores concentraciones de AP en el hipotálamo y puente (aproximadamente 4 nmol/g de tejido húmedo); en el cerebelo, cuerpo estriado y mesencéfalo, concentraciones medias (entre 3.53 y 2.42 nmol/g de tejido húmedo); y menores en hipocampo, bulbo olfatorio, corteza y tálamo (de 1.71 a 1.91 nmol/g de tejido húmedo aproximadamente). Por otro lado, en el cerebelo e hipotálamo de ratón, se detectaron las concentraciones mayores de AP, que resultaron ser de  $8.13 \pm 1.14$  y  $7.93 \pm 0.55$  nmol/g de tejido, respectivamente (52).

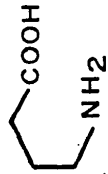
También se han realizado estudios de cuantificación y del transporte del AP. Utilizando espectrometría de masas, se determinó una concentración de  $18 \pm 4$  nmol/g en el cerebro de ratón (31) que es aproximada a la reportada por Kasá en el cerebro de perro (47). Ambrose y col. midiendo el índice de captura cerebral de L-AP, identificaron a la corteza cerebral como la región hacia la que el AP se transporta con mayor velocidad (2).

Esta tendencia del AP a concentrarse en sitios determinados, se ha estudiado siguiendo enfoques diferentes.

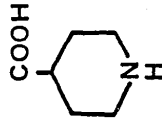
En 1978 se realizaron experimentos en los que se probó la interacción del AP con la captura de varios neurotransmisores en fracciones P2, resultando inhibida solo la captura de <sup>14</sup>C-GABA - (71). Más tarde se encontró que la liberación de AP es depen -



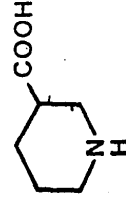
Acido piperidico



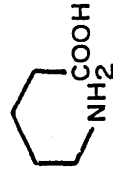
Acido 4-Amino-n-butirico



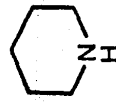
Acido Isonipecoico



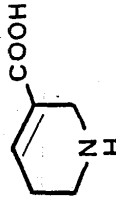
Acido nipecoico



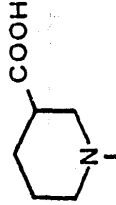
Acido 5-Amino-n-valerico



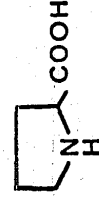
Piperidina



Guvacina



CH<sub>3</sub>  
Arecajdina



Prolina



Glicina

FIG. 7. Acido piperidico y compuestos relacionados estructuralmente. Tomado de Giacòbini, E. y col. (31).

diente de  $\text{Ca}^{++}$  y puede evocarse con altas concentraciones de  $\text{K}^{+}$  en rebanadas de cerebro de rata (73, 48). Precisamente en este tipo de preparación (rebanadas), se encontró un aumento de la liberación de 14C-GABA inducida por alto  $\text{K}^{+}$  (77), en presencia de AP. También el AP posee un sistema de captura dependiente de  $\text{Na}^{+}$ , sensible a la temperatura y a la ouabaina, el cual consta de dos componentes; uno de alta afinidad ( $K_m = 3.9 \pm 0.17 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) y otro de baja afinidad, cuya  $K_m = 90.2 \pm 4.3 \times 10^{-6} \text{ M}$  (65, 74, 48). Todos estos descubrimientos representaron una alternativa para explicar por qué este aminoácido es acumulado en el cerebro, a diferencia de lo que ocurre en otros órganos de los cuales se elimina rápidamente según se ha observado después de inyecciones intraperitoneales e intravenosas (70). Además son las primeras evidencias de una localización neuronal de este aminoácido y la suposición de alguna función específica en el cerebro.

Por otra parte, el AP ha llamado la atención por encontrarse en niveles elevados en pacientes afectados por desórdenes metabólicos como la hiperpícolatemia (29, 103, 4, 104) o la hiperlisinemia (108) u otros padecimientos como el hipertiroidismo (95), el kwashiorkor (107) y el síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger (7). Un síntoma común a todos éstos, es el retraso mental y degeneración progresiva del sistema nervioso central. Los efectos devastadores de la hiperpícolatemia en el sistema nervioso central humano sugieren que el AP, o alguno de sus metabolitos, se acumulan en el cerebro ejerciendo efectos tóxicos y que además, la secreción, catabolismo y anabolismo del AP, son esenciales para el funcionamiento y desarrollo normal del cerebro (32).

Suponiendo una función del AP en el sistema nervioso, se estudio más recientemente, cuál podría ser ésta, en neuronas corticales y piramidales del cerebro de rata mediante técnicas microelectroforéticas, y se determinó un efecto inhibitorio sobre su actividad unitaria (49). Posteriormente, se encontró que dicho efecto podía revertirse por bicuculina y no por estricnina. Adicionalmente, se encontró que la estructura estérica del AP es similar a una porción de la D-bicuculina (98). Takahama y col. reportan que la respuesta de GABA en las mismas neuronas es aumentada por el AP en una forma dependiente de la intensidad de la corriente (79).

Los estudios de unión específica de 3H-AP, han proporcionado también datos muy valiosos: en el cerebro de ratón, la unión específica de 3H-AP de alta afinidad ( $K_d = 33.2 \text{ nM}$ ) es dependiente de  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{Cl}^{-}$  (33). La corteza cerebral de ratón representa la zona con mayor concentración de sitios de unión para el AP. El talamo, bulbo olfatorio, hipocampo y cerebelo mostraron concentraciones decrecientes (Tabla 4). Otro hallazgo es que el sitio de unión de AP es desplazado por compuestos similares estructuralmente como la prolina (34).

Durante la ontogenia se han encontrado los mayores niveles de AP en el cerebro de ratón entre los 17 y 20 días de gestación. Es notable una disminución de estos niveles desde el primer día de nacimiento, alcanzando al sexto día, una tercera parte de la concentración del recién nacido. Al parecer, esto indica que la barrera hematoencefálica es inmadura e incompleta. En adultos, el AP se concentra más en riñón e hígado (53).

T A B L A # 4

Distribución Regional de Unión de 3H-AP en la Fracción  
Cruda P2 de Cerebro de Ratón (34)

Región	Unión específica (fmol/mg. de pro <u>te</u> teína).
Bulbo Olfatorio	3.73 ± 0.07
Corteza Cerebral	10.78 ± 2.42
Cuerpo Estriado	no detectable.
Tálamo	4.12 ± 0.68
Mesencéfalo	no detectable.
Hipocampo	1.68 ± 0.35
Cerebelo	0.67 ± 0.46
Puente y Médula	no detectable.

## 2) METABOLISMO Y DEGRADACION DEL ACIDO PIPECOLICO

A través de estudios en ratones inyectados intraperitonealmente, se ha sugerido que el ácido pipercolico tiene una baja actividad metabólica en el cerebro, pues es recuperado aproximadamente en un 70% a 80% (70).

En el riñón de rata "in vitro" e "in vivo", se encuentra una mayor velocidad de formación de AP que en el cerebro; sólo que es secretado rápidamente por el riñón en la orina, mientras que en el cerebro es acumulado. En el hombre sólo se han encontrado residuos de AP en la orina de sujetos hiperpipercolatémicos (29).

El AP es formado aún desde estados embrionarios en el cerebro de ratón a los 13 días de gestación, a partir de L-lisina. En el conejo se ha encontrado una excepción, que consiste en que el hígado metaboliza únicamente el isómero L, sin embargo, en el riñón, "in vitro", sí es capaz de metabolizar los dos isómeros (21).

A la fecha, el AP se ha caracterizado como el principal producto de la degradación de lisina (Fig. 8) "in vivo" e "in vitro" en el cerebro y otros órganos en mamíferos (66, 87, 73, 35, 18) y pollo (72).

Se reconocen dos rutas alternativas para el catabolismo de lisina, que convergen para producir ácido alfa-aminoadípico; por un lado se encuentra la vía que tiene como intermediario a la sacaroceína y por otro, la que implica al AP, siendo esta vía de mayor importancia en el cerebro, y la primera en el hígado (84, 36, 39, 35, 16, 18). La síntesis del AP se encuentra relacionada con el metabolismo de prolina a través de una enzima común para ambos, la delta-pirrolin-2-carboxilato reductasa. En el metabolismo de prolina se encarga de la reducción del delta-pirrolin-2-carboxilato para producir L-prolina, mientras que también reduce el delta-piperidin-2-carboxilato para formar L-AP. En condiciones fisiológicas, se desconoce qué sustrato es preferido por dicha enzima (28).

En estudios de distribución de la actividad de la delta-pirrolin-2-carboxilato reductasa, en el sistema nervioso central de ratón, perro y mono, se detectaron grandes semejanzas. La enzima se encuentra más activa en la corteza cerebral, en el mesencéfalo y puente, la actividad es significativamente menor, y nula en el cerebelo y la médula. En la corteza cerebral, la actividad enzimática es máxima en la porción frontal y temporal, y mínima en la corteza occipital. Estos resultados son apoyados por las cantidades de 14C-AP y 3H-AP recuperadas de la fracción soluble del telencéfalo y cerebelo de ratón después de administrar 14C-L-lisina y 3H-D-lisina (28).

La degradación de AP a ácido alfa-aminoadípico ocurre teniendo como intermediario el ácido-delta 6-piperidin-2-carboxílico (66).

Otra posible vía de degradación del ácido pipercolico "in vitro" e "in vivo" ocurre a través de la piperidina (45, 46, 28). Al parecer no representa una ruta metabólica importante pues se ha mostrado que su formación con el AP como precursor, es mínima en el cerebro y riñón de pollo (72) y ratón adulto (87, 31).

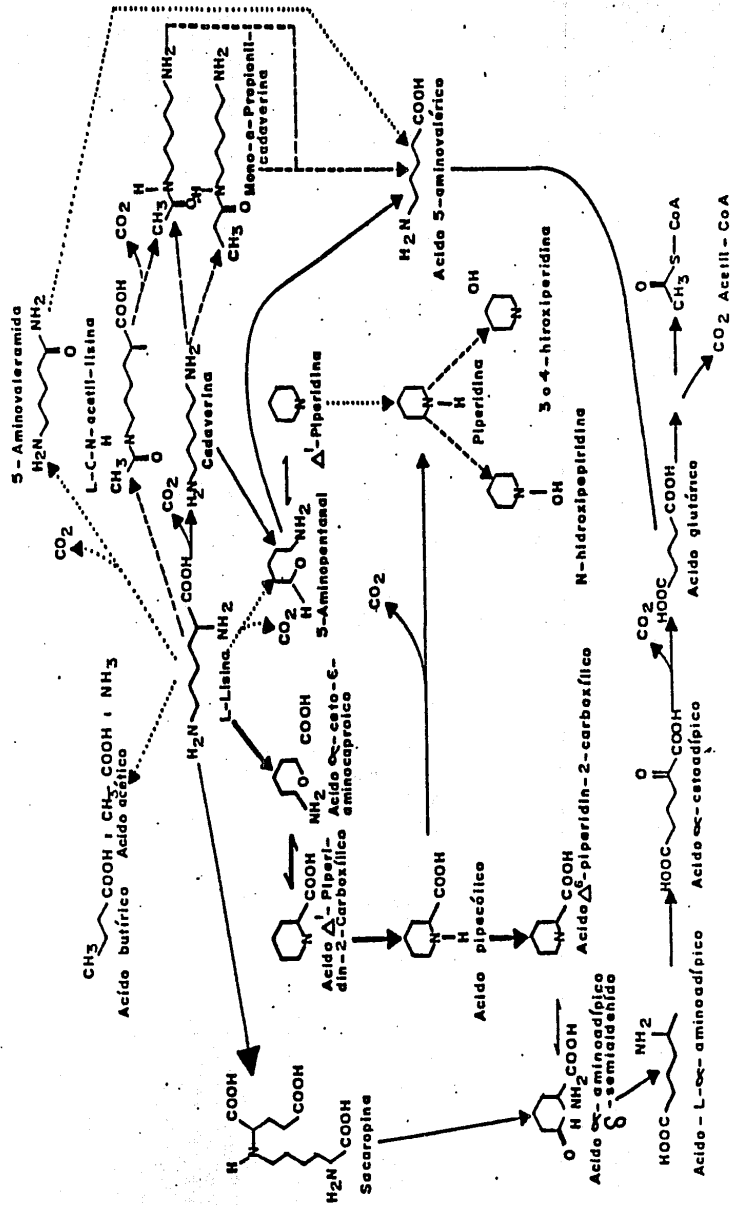


FIG. 8. Rutas de síntesis y degradación del ácido piperocólico. En línea gruesa se señala la ruta fisiológicamente más importante que ocurre en el sistema nervioso central de mamíferos. Tomado de Giacobini, E. y col. (31).

### 3) RELACION GABA-ACIDO PIPECOLICO

De la serie de antecedentes del AP que se han resumido en los incisos anteriores, destacan algunos que respaldan la idea de una estrecha relación entre este aminoácido y el GABA y dan lugar a los objetivos perseguidos en este trabajo.

La distribución regional del AP, así como sus patrones de captación y liberación dependientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  respectivamente (73, 48, 74), sugirieron inicialmente alguna función de este aminoácido en el sistema nervioso central de mamíferos.

Son relevantes los descubrimientos de Nomura y col. (73) y Okuma y col. (77), para establecer una relación entre el AP y el GABA. Estudios neurofisiológicos en rata, donde el efecto inhibitorio del AP podía ser antagonizado por bicuculina, apoyaron fuertemente la supuesta interacción entre el GABA y el AP (49, 98). En particular, los hallazgos de Takahama y col. (1982) permiten suponer la existencia de receptores de membrana específicos para AP, es decir, que la interacción tendría lugar a nivel postsináptico. El hecho de que coexista este aminoácido con un aminoácido particular (GABA), y que tenga la capacidad de influir en su captación y liberación, puede indicar que el AP funcione como neuromodulador de la transmisión GABAérgica.

Sin embargo, los estudios de receptores indican la presencia de un sitio de unión de AP de alta afinidad ( $K_D = 33.2 \text{ nM}$ ) que no es común para GABA. También es conocido que el GABA afecta la unión de  $^3\text{H}$ -AP, en función de las concentraciones de AP y GABA. Las concentraciones menores de GABA aumentaron la unión específica del AP radiactivo, mientras que las concentraciones mayores disminuyeron esta unión. La observación anterior puede significar que el GABA ejerce un efecto modulador sobre la unión de  $^3\text{H}$ -AP. Evidentemente, estos hallazgos se contraponen a lo sugerido por los estudios neurofisiológicos. Esto se debe a que los estudios de receptores sugieren que el efecto farmacológico del AP, se produce por su interacción con el sistema GABAérgico, posiblemente a nivel presináptico (33, 34).

Actualmente, aún se especula acerca de la posibilidad de que el AP actúe como neuromodulador. De los estudios anteriores, surgen 2 hipótesis que intentan explicar los mecanismos de acción del efecto modulador del AP (Fig. 9).

a) Es probable que la modulación ocurra a partir de terminales que liberan AP y GABA donde el AP actúa sobre un sitio regulador en el receptor postsináptico de GABA.

b) El efecto modulador del AP puede ocurrir por control de la concentración de GABA en el espacio sináptico; al inhibir su recaptación hacia células gliales y neuronales, o bien, aumentando su liberación.



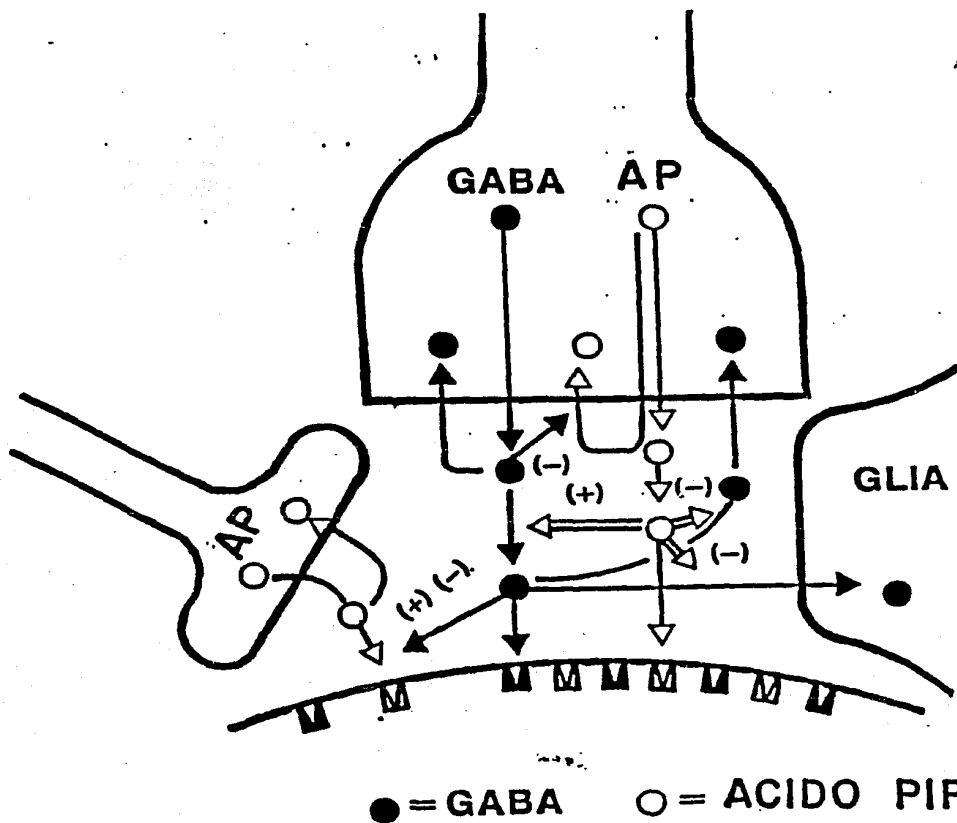


FIG. 9. Esquema de las hipótesis del ácido pipecólico como neuromodulador de la transmisión GABAérgica. En la figura se muestran dos posibilidades: 1) probablemente existen terminales que contengan AP, que lo liberen y que ejerza su acción a nivel de receptores a AP. 2) Por otra parte, el AP podría coexistir con GABA en una misma terminal sináptica; el AP puede influir en la cantidad de GABA en el espacio sináptico, por aumentar la cantidad liberada del neurotransmisor, o por inhibir su recaptura hacia células gliales y neuronales. Tomado de Giacobini, E. y col. (33).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Probar el posible papel del AP como neuromodulador de la transmisión GABAérgica a nivel presináptico.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar el efecto del AP sobre la captura de 3H-GABA en rebanadas de corteza cerebral de ratón.
- 2) Determinar el efecto del AP sobre la liberación espontánea e inducida por alto  $K^+$  de 3H-GABA, en presencia y ausencia de  $Ca^{++}$  en rebanadas de corteza cerebral de ratón.
- 3) Evaluar a nivel glial y neuronal los efectos presinápticos del AP, observados en las diferentes condiciones experimentales.

## HIPOTESIS

Con base en los antecedentes del ácido pipecólico acerca de su posible función en la transmisión GABAérgica, al incubar rebanadas de corteza cerebral de ratón en presencia de ácido pipecólico, se espera un aumento de la concentración de 3H-GABA en el medio de incubación o de superfusión, ya sea por estimulación en la liberación inducida por alto potasio, y/o por inhibición de la recaptura de 3H-GABA. Este posible aumento en la liberación o disminución en la captura, sugeriría que el ácido pipecólico ejerce un efecto sobre el sistema GABAérgico, a nivel presináptico.

## SEGUNDA PARTE

# MÉTODOS EXPERIMENTALES Y RESULTADOS

## CAPITULO V

### MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES

La mayor parte de los reactivos utilizados en la preparación de soluciones se obtuvieron de Merck-México; las siguientes drogas: D-L-ácido pipecólico, ácido aminooxiacético, ouabaína (O-Siroantina), GABA, Etilenglicol-bis-beta-amino-etiléter, Ácido N,N'-Tetracético (ESTA), beta-alanina y R-S ácido nipecótico, procedieron de Sigma Chemical Co.; el disolvente de tejidos NCS de Amersham, Arlington Heights, Ill. U.S.A. El GABA radioactivo 3H-GABA (actividad específica de 84.7 Ci/mmol) se obtuvo de la compañía New England Nuclear.

Para todos los experimentos se utilizaron ratones albinos machos de 2 a 3 meses de edad (20-30g) que fueron sacrificados por dislocación cervical. Se realizó la disección de la corteza anterior (o prefrontal) y se obtuvieron, manualmente, rebanadas con un grosor aproximado de 150 a 200  $\mu\text{m}$ .

Se llevaron a cabo los siguientes experimentos en presencia y ausencia de D-L-ácido pipecólico (AP) con una concentración  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ :

#### 1) EXPERIMENTOS DE CAPTURA

- a) Captura de 3H-GABA a 37 y 4 grados centígrados.
- b) Captura de 3H-GABA en presencia de ácido nipecótico (100  $\mu\text{M}$ ) a 37 y 4 grados centígrados.
- c) Captura de 3H-GABA en presencia de beta-alanina (100  $\mu\text{M}$ ) a 37 y 4 grados centígrados.

#### 2) EXPERIMENTOS DE LIBERACION

##### a) POR EL METODO DE INCUBACION

- i) Liberación de 3H-GABA dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  inducida con alta concentración de  $\text{K}^{+}$  (15 mM).
- ii) Liberación de 3H-GABA independiente de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por alto  $\text{K}^{+}$  (15 mM).
- iii) Liberación de 3H-GABA dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  en presencia de beta-alanina (100  $\mu\text{M}$ ) durante la captura.
- iv) Liberación de 3H-GABA dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  en presencia de ácido nipecótico (100  $\mu\text{M}$ ) durante la captura.

## b) POR EL METODO DE SUPERFUSION

- i) Liberación de 3H-GABA dependiente de  $Ca^{++}$  con alta concentración de  $K^+$  (15 mM).
- ii) Liberación de 3H-GABA independiente de  $Ca^{++}$  inducida por alto  $K^+$  (15 mM).
- iii) Liberación de 3H-GABA dependiente de  $Ca^{++}$  con alta concentración de  $K^+$  (15 mM), en presencia de beta-alanina (100  $\mu$ M) durante la superfusión.
- iv) Liberación dependiente de  $Ca^{++}$  con alta concentración de  $K^+$  (15 mM) más ácido nípecóico (100  $\mu$ M) durante la superfusión.

## 1) EXPERIMENTOS DE CAPTURA

a) Para estos experimentos se utilizó un medio de captura Krebs-Ringer modificado, cuya composición fue la siguiente: NaCl 118 mM,  $KH_2PO_4$  1.2 mM, KCl 4.7 mM,  $CaCl_2$  2.5 mM,  $MgSO_4$  1.17 mM, Tris 54 mM a un pH de 7.4, y glucosa 5.6 mM, además se agregó ácido aminooxipropiónico ( $1 \times 10^{-4}$  M) con objeto de evitar la degradación del 3H-GABA por la GABA-T. El medio se mantuvo previamente en oxigenación con mezcla  $O_2/CO_2$  (95%/5%) durante 20 minutos a 37 grados centígrados. Se usaron dos rebanadas de corteza anterior que se dividieron en dos y se colocaron en 2 ml de medio de captura a 37 grados centígrados con oxigenación constante. Después de 5 minutos de preincubación, se añadieron 75  $\mu$ l de una mezcla de GABA no tritado y 3H-GABA (0.22 nanomoles); a partir de este momento las rebanadas se sacaron a los minutos 1 y 5 respectivamente. Simultáneamente, se hicieron capturas de la misma forma pero a 4 grados centígrados. También se hicieron experimentos paralelos a 37 y 4 grados centígrados añadiendo D-AP ( $1 \times 10^{-4}$  M) en el medio de captura. Después de ser extraídas, las rebanadas fueron lavadas inmediatamente en un filtro Millipore de vacío con medio de captura frío y se colocaron en pequeños viales. Una vez solubilizados los tejidos en 200  $\mu$ l de NaOH (1 N), se tomó una alícuota de 30  $\mu$ l a la que se le agregó 10 ml de líquido de centelleo Tritosol para medir la radioactividad, y 2 alícuotas de 50  $\mu$ l para cuantificar proteínas por el método de Lowry y col. (63). Los resultados de los experimentos de captura se analizaron mediante la prueba estadística t de Student.

b) El método para estos experimentos es igual al del inciso a), sólo que se agregó ácido nípecóico (100  $\mu$ M) durante la captura.

c) En estos experimentos, se utilizó la misma metodología que en los casos anteriores, sólo que se agregó beta-alanina (100  $\mu$ M) durante la captura.

## 2) EXPERIMENTOS DE LIBERACION

Para estos experimentos se utilizaron medios de captura y liberación Krebs-Ringer modificados, el de liberación difiere del primero, sólo en su concentración de KCl que fue de 15 mM lo que permite una despolarización parcial de las neuronas, y la concentración de NaCl que fue de 108,5 mM. Ambos medios se oxigenaron previamente con una mezcla O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%) durante 20 minutos a 37 grados centígrados. En todos los casos, las rebanadas fueron pretratadas en medio de liberación y ouabaina (1 X 10<sup>-5</sup> M) y lavadas en seguida.

### a) POR EL METODO DE INCUBACION

i) Este método (Fig. 10) está reportado por Roberts y Sharif (82). En nuestro caso, se utilizaron dos rebanadas que se incubaron a 37 grados centígrados con 25  $\mu$ l de 3H-GABA (100  $\mu$ Ci/ml) en 2 ml de medio de captura con oxigenación constante durante 20 minutos. Todo el experimento prosigue a 37 grados centígrados. Al final de la incubación se lavaron las rebanadas en el medio de captura y se colocaron en cámaras separadas conteniendo 1.5 ml del mismo medio y una exposición al AP; en este caso, se hicieron experimentos preliminares con D-L-AP en concentraciones de 1 X 10<sup>-4</sup> M y 1 X 10<sup>-8</sup> M. Las rebanadas se transfirieron de nuevo a una cámara con 1.5 ml de medio de captura, a partir de este momento se tomaron 7 alícuotas de 75  $\mu$ l a intervalos de 20, 40 ó 30 segundos, que fueron colocadas en viales de centelleo. Estas primeras alícuotas representan la liberación espontánea. En seguida se enjuagaron las rebanadas en medio de captura con objeto de quitar el exceso de radioactividad en las mismas. Se pasaron después a una cámara con 1.5 ml de medio de liberación, tomando 7 alícuotas de 75  $\mu$ l a los mismos intervalos que las anteriores. Estas últimas representan la liberación parcial inducida por una alta concentración de K<sup>+</sup>. A cada alícuota se le agregaron 10 ml de líquido de centelleo Tritosol. Las rebanadas se disolvieron por separado en 0.1 ml de NCS (solubilizador de tejidos) y se les agregaron 10 ml de Tritosol para ser medida la radioactividad en un contador de centelleo. Los datos se analizaron utilizando la prueba estadística t de Student.

ii) Estos experimentos se realizaron con el mismo procedimiento que los anteriores, con la excepción de que al medio de liberación le fue sustituido el CaCl<sub>2</sub> por EGTA (1 mM) como agente quelante. En este caso se tomaron 10 alícuotas de 75  $\mu$ l cada 20 segundos.

iii) Estos experimentos se hicieron utilizando el medio de liberación con alto K<sup>+</sup> (15 mM), previa incubación de las rebanadas en un medio de captura en presencia de beta-alanina (100  $\mu$ M). Las 6 alícuotas de estos experimentos se tomaron a intervalos de 20, 40 ó 30 segundos.

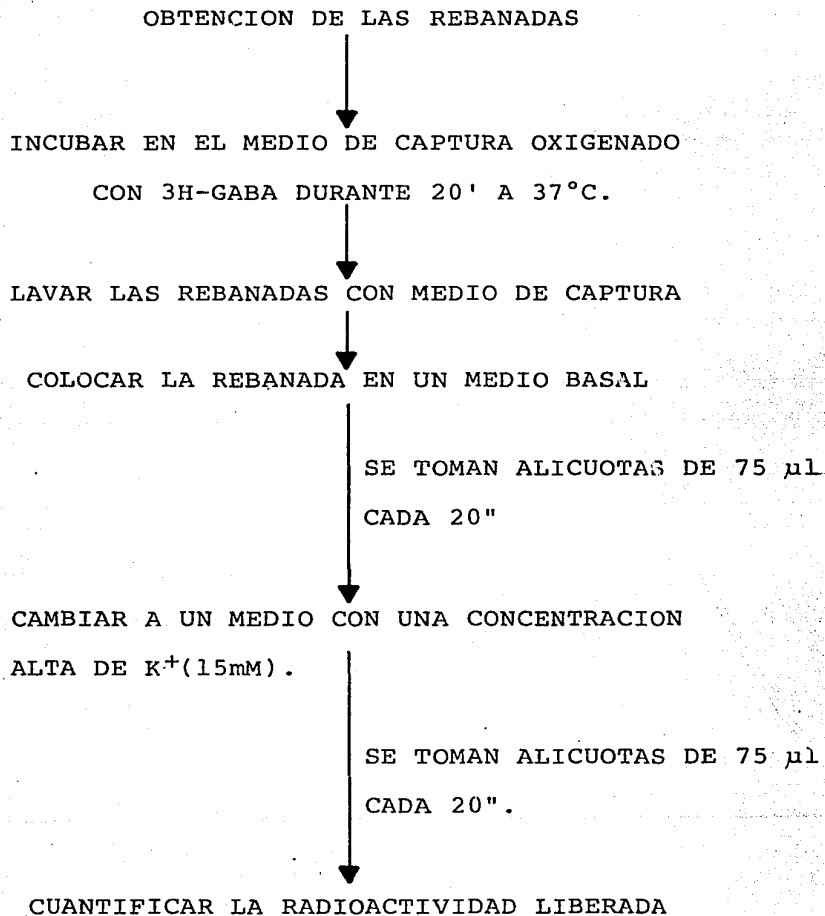


Fig. 10. Esquema de la metodología utilizada en los experimentos de liberación-- de 3H-GABA por incubación.



iv) En estos experimentos se realizó la captura de 3H-GABA en presencia de ácido nípecóico (100  $\mu$ M) con el mismo procedimiento y medio de liberación de la serie anterior (inciso iii). Las 7 alícuotas de esta serie se tomaron a intervalos iguales a los del inciso iii).

#### b) POR EL METODO DE SUPERFUSION

Cada serie de estos experimentos, se realizó de manera similar a la descrita por Katz (51), paralelamente con su control (Fig. 11).

i) En estos experimentos realizados también a 37 grados centígrados se utilizaron dos rebanadas de corteza pretratadas con el medio de liberación y cuabaina ( $1 \times 10^{-5}$  M). Después se lavaron e incubaron con 75  $\mu$ l de una mezcla de GABA no tritiado y 25  $\mu$ l de 3H-GABA (0.22 nanomolas) en 2 ml de medio de captura y en oxigenación constante durante 20 minutos. Las rebanadas se lavaron en medio de captura y se colocaron separadas en las cámaras de superfusión lavando durante los primeros 10 minutos con el medio Krebs-Ringer normal a una velocidad de 1.5 ml/min. Entonces se inició la colecta de muestras en viales de centelleo a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. Después de 5 minutos se cambió al medio de liberación con y sin AP respectivamente durante 15 minutos más a la misma velocidad de flujo. Se añadió a las muestras y a los tejidos ya disueltos en NCS, 8 ml de Tritosol para cuantificar la radioactividad liberada, en un contador de centelleo. Al igual que los demás datos, los resultados obtenidos en las liberaciones por superfusión, se analizaron con una prueba t de Student.

ii) Estos experimentos se realizaron siguiendo el mismo procedimiento del inciso anterior, solo que el medio de liberación careció de  $\text{CaCl}_2$  que se sustituyó con EGTA (1 mM).

iii) Esta serie se realizó simultáneamente con los anteriores, en presencia de  $\text{Ca}^{++}$  (inciso i). En estos experimentos se utilizaron rebanadas en presencia de beta-alanina (100  $\mu$ M), que fue agregada a los medios de captura y liberación y fueron tratadas en condiciones control y en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M).

iv) De manera similar a los anteriores, los experimentos con ácido nípecóico se realizaron en paralelo con los del tipo i). También estas rebanadas, control y con AP ( $1 \times 10^{-4}$  M) se trataron en presencia durante la captura y la liberación, de ácido nípecóico (100  $\mu$ M) que fue adicionado a los medios.

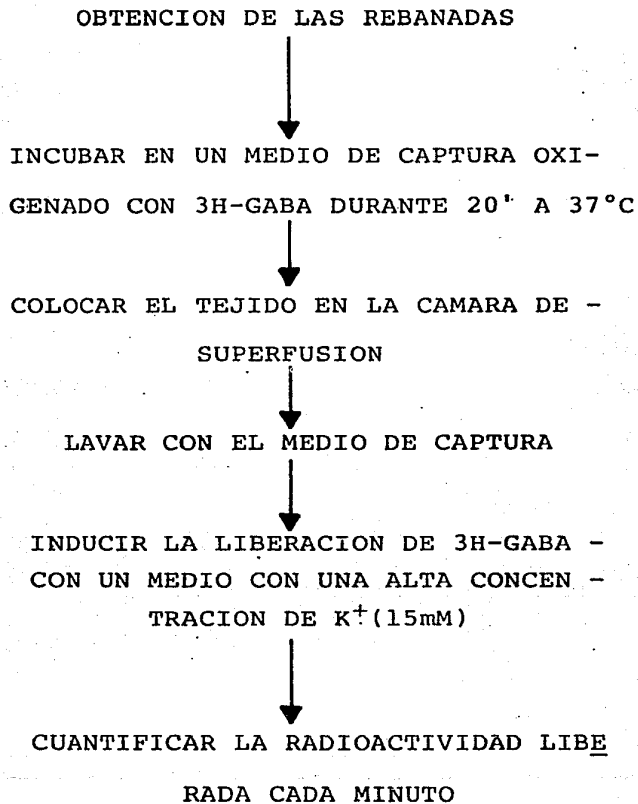


Fig. 11. Esquema de la metodología-  
utilizada en los experimen-  
tos de liberación de 3H-GA-  
BA por superfusión.

## CAPITULO VI

### RESULTADOS

#### 1) CAPTURA DE 3H-GABA EN PRESENCIA DE ACIDO PIPECOLICO

Los datos obtenidos de los experimentos de captura de 3H-GABA se evaluaron en dpm/mg de proteína en forma neta, es decir, la captura resultante a 37 grados centígrados menos la efectuada a 4 grados centígrados. En la tabla 5 se muestran los valores de captura obtenidos para las diferentes condiciones. En la tabla se considera a los controles respectivos como el 100%, y a las capturas de 3H-GABA en condiciones normales, o en presencia de beta-alanina o de ácido pipécotico como fracciones del porcentaje control.

En presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M) es evidente una ligera inhibición de la captura, aproximadamente del 20 y del 13%, respecto a sus controles correspondientes al minuto y 5 minutos de incubación (n=9 para ambos tiempos). Esta disminución no fue estadísticamente significativa.

En los experimentos de captura donde la variante fue el uso de beta-alanina (100  $\mu$ M), encontramos a un minuto (n=6), una inhibición no significativa del 32%, y a los 5 minutos (n=9), una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 36%.

Por otra parte, en presencia de ácido pipécotico (100 $\mu$ M), es sobresaliente el hecho de que a los dos tiempos de incubación se observa una estimulación de la captura respecto al control correspondiente (n=7 para ambos tiempos). A un minuto se observa un incremento del 46% y a los 5 minutos, un aumento del 18%, sin embargo, estas estimulaciones aparentes resultaron no significativas.

#### 2) LIBERACION DE 3H-GABA POR EL METODO DE INCUBACION

##### a) Liberación espontánea de 3H-GABA

Las liberaciones de 3H-GABA en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$ M) en un medio Krebs-Ringer normal a distintos tiempos, se muestra en la Fig. 12 (n=5). Los valores liberados en todos los experimentos, representan el porcentaje de 3H-GABA respecto al total capturado por la rebanada correspondiente. No se encontraron diferencias significativas entre los experimentos control y los expuestos al AP. A su vez, la radioactividad liberada espontáneamente, es comparable a la obtenida en presencia de ácido pipécotico o beta-alanina y en ausencia de  $Ca^{++}$ .

##### b) Liberaciones de 3H-GABA por estimulación con alto $K^+$ en presencia de $Ca^{++}$

Por otro lado, en la liberación inducida por una despolarización parcial con  $K^+$  15 mM (Fig. 13) en experimentos preliminares (n=4) utilizando dos concentraciones de AP ( $1 \times 10^{-4}$  -

TABLA # 5

CAPTURA DE 3H-GABA EN REBANADAS DE CORTEZA  
CEREBRAL DE RATON

% DE CAPTURA RESPECTO AL CONTROL

t (min)

CONDICION	1'	5'
AP	0.80 ± 0.17 (9)	0.87 ± 0.12 (9)
BETA-ALA + AP	0.68 ± 0.16 (6)	0.64 ± 0.08 (9) *
AC. NIPECOTICO + AP	1.46 ± 0.13 (7)	1.16 ± 0.25 (7)

Los valores representados son  $\bar{X} \pm$  SEM del número de experimentos que se muestran en los paréntesis.

\* En esta serie de experimentos se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

Por ciento de liberación  
de  $^3\text{H}$ -GABA.

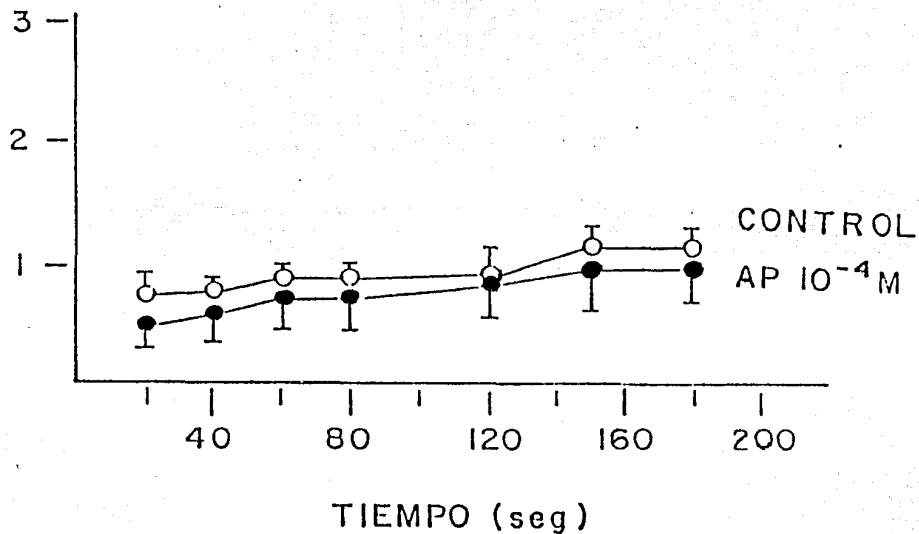


Fig. 12 Por ciento de liberación espontánea de  $^3\text{H}$ -GABA por incubación de rebanadas de corteza cerebral de ratón a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 minutos. Los círculos blancos representan la liberación en condiciones control y los círculos negros, la liberación en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M). Los datos son  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  de 5 experimentos.

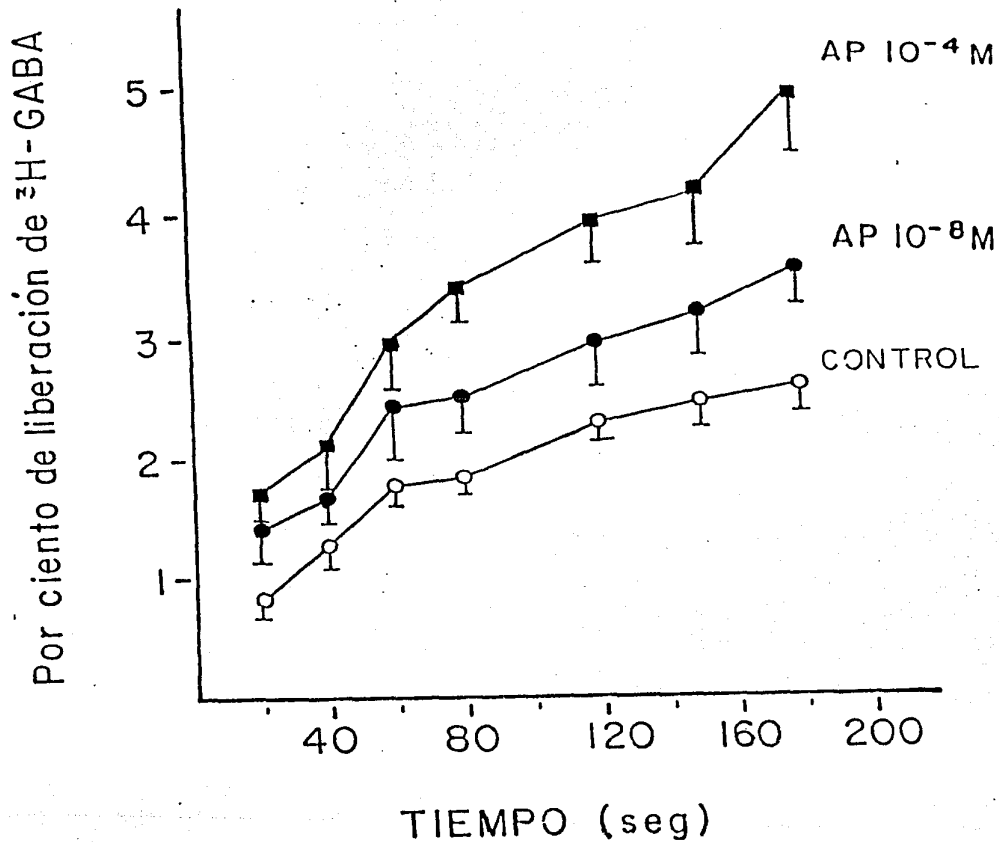


Fig. 13 Por ciento de liberación de <sup>3</sup>H-GABA por incubación de rebanadas de corteza cerebral de ratón a 37°C durante 3 minutos, en un medio con K<sup>+</sup> 15 mM en presencia de Ca<sup>++</sup>. Los círculos blancos representan la liberación en condiciones control, los círculos negros representan la liberación en presencia de AP (1 X 10<sup>-8</sup> M) y los cuadros negros, la liberación en presencia de AP 1 X 10<sup>-4</sup> M. Los valores son  $\bar{X} \pm$  SEM de 4 experimentos.

8 M y  $1 \times 10^{-4}$  M), no se encontraron diferencias significativas respecto al control para la concentración menor, a excepción de los 60 y 180 segundos ( $p < 0.1$ ). Por el contrario, sí hubo diferencias importantes con el AP  $1 \times 10^{-4}$  M en la mayor parte de los tiempos. A los 20 segundos ( $p < 0.1$ ), a los 60 y 150 segundos ( $p < 0.05$ ), y a los 80, 120 y 180 segundos ( $p < 0.01$ ). Las diferencias observadas consisten en incrementos en la liberación de 3H-GABA, mayores al 170% en relación a los controles.

La liberación de 3H-GABA por células neuronales, ( $n=4$ ) es decir, cuando la captura se hizo en presencia de beta-alanina, se muestra en la Fig. 14. En presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M), alcanzó niveles comparables a los cuantificados en los experimentos en los que se considera a las porciones neuronal y glial (Fig. 13). Las diferencias respecto al control para beta-alanina más AP fueron significativas a los 60 y 150 segundos ( $p < 0.1$ ), y a los 80 y 120 segundos ( $p < 0.05$ ). El aumento en la liberación de 3H-GABA en este caso, fue cercano al 150% sobre el control.

En el caso de la liberación de 3H-GABA, evaluada en rebanadas en presencia de ácido nípecoítico durante la captura ( $n=7$ ), considerada proveniente en su mayor parte de células gliales (Fig. 15), destaca que el control se encuentra por encima de los niveles de 3H-GABA en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M). Es sobresaliente que en estas condiciones, no se observó una liberación notable, es decir, que durante todo el tiempo de estimulación con alto  $K^+$ , los porcentajes de 3H-GABA liberados oscilaron alrededor del 2% para el control y del 1.5% en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M). Sin embargo, estas diferencias fueron estadísticamente no significativas.

### c) Liberación de 3H-GABA por estimulación con alto $K^+$ en ausencia de $Ca^{++}$

En ausencia de  $Ca^{++}$  se ve disminuida la liberación de 3H-GABA, aunque no completamente. En condiciones control se alcanzó un 2% y con AP aproximadamente un 2.8% de liberación máxima, valores que representan una disminución del 0.3% y del 2.5% respecto a las liberaciones con  $Ca^{++}$ , respectivamente. En presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M) se muestra un ligero aumento respecto al control correspondiente (Fig. 16), que estadísticamente resultó no significativo ( $n=8$ ).

## 3) LIBERACION DE 3H-GABA POR EL METODO DE SUPERFUSION

### a) En presencia de $Ca^{++}$ con $K^+$ como agente despolarizante

Al igual que en los experimentos por incubación, las gráficas de liberación de 3H-GABA son representadas, considerando el por ciento liberado respecto al total capturado por la rebanada, en función del tiempo. Partiendo de un nivel basal cercano al 1%, se alcanzan después de la estimulación con alto  $K^+$ , valores de entre un 6 y 7% en condiciones control y en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M), respectivamente. Las diferencias aparentes (Fig. 17), no resultaron estadísticamente significativas ( $n=7$ ).

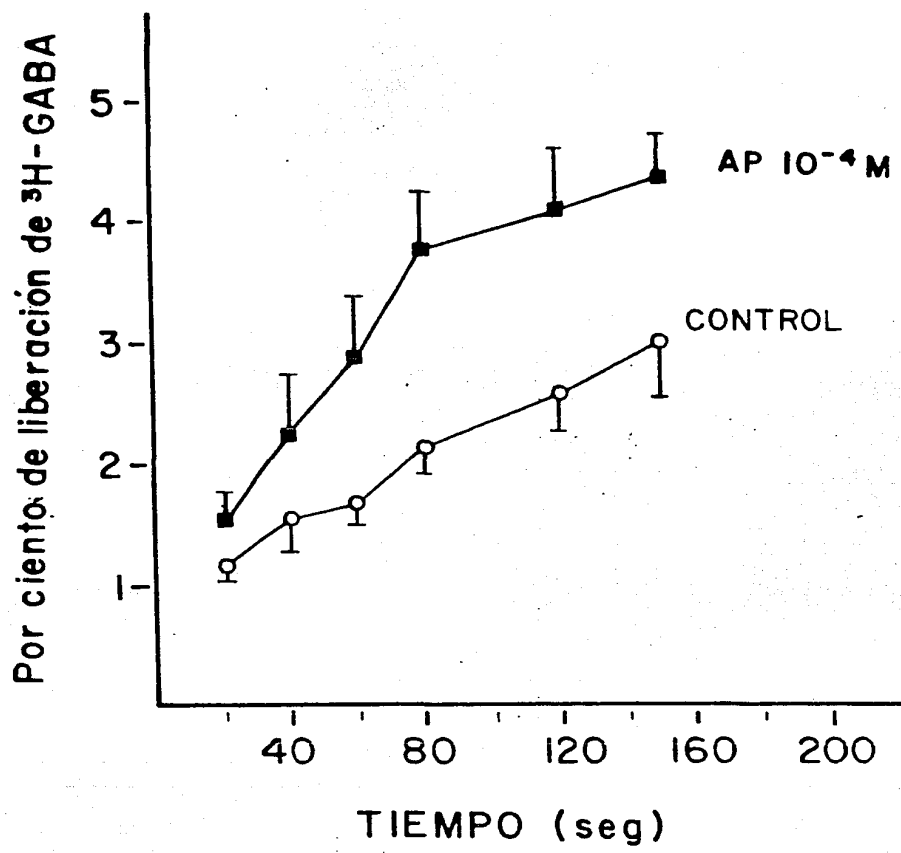


Fig. 14 Por ciento de liberación neuronal de  $^3\text{H}$ -GABA por incubación de rebanadas de corteza cerebral de ratón a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 minutos en un medio con  $\text{K}^+$  15 mM en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . Los círculos blancos representan la liberación en condiciones control y los cuadros negros, representan la liberación proveniente de rebanadas en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M), cuya captura se realizó en presencia de beta-alanina. Los valores son  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  de 4 experimentos.



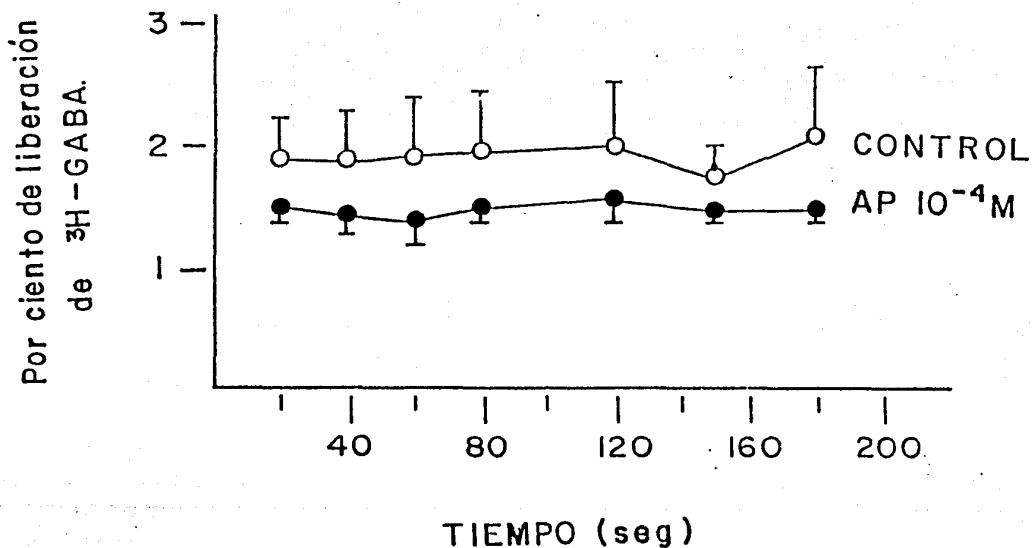


Fig. 15 Por ciento de liberación glial de  $^3\text{H}$ -GABA por incubación de rebanadas de corteza cerebral de ratón a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 minutos en un medio con  $\text{K}^+$  15 mM en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . Los círculos blancos representan la liberación de las rebanadas control y los círculos negros representan la liberación proveniente de rebanadas en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ), cuya captura se realizó en presencia de ácido nicotínico. Los valores son  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  de 7 experimentos.

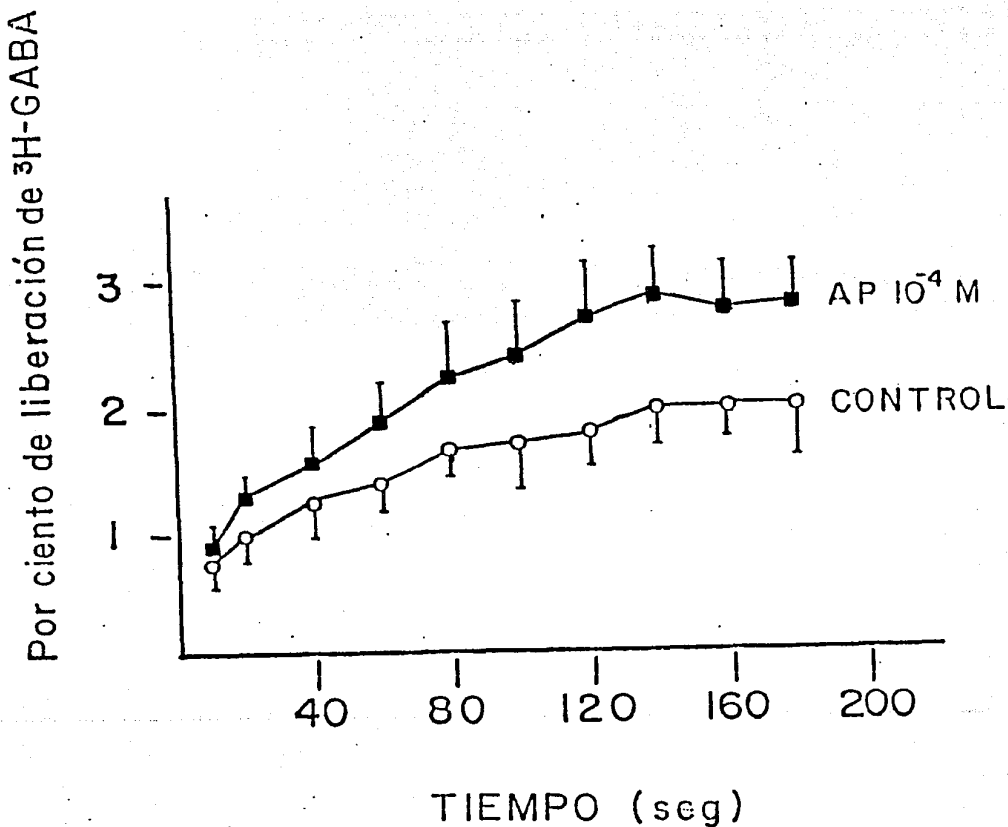


Fig. 16 Por ciento de liberación de <sup>3</sup>H-GABA inducida por K<sup>+</sup> 15 mM por incubación de rebanadas de corteza cerebral de ratón en ausencia de Ca<sup>++</sup>. Los círculos blancos muestran la liberación en condiciones control y los cuadros negros muestran la liberación proveniente de rebanadas en presencia de AP (1 X 10<sup>-4</sup> M). Los valores son  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  de 8 experimentos.

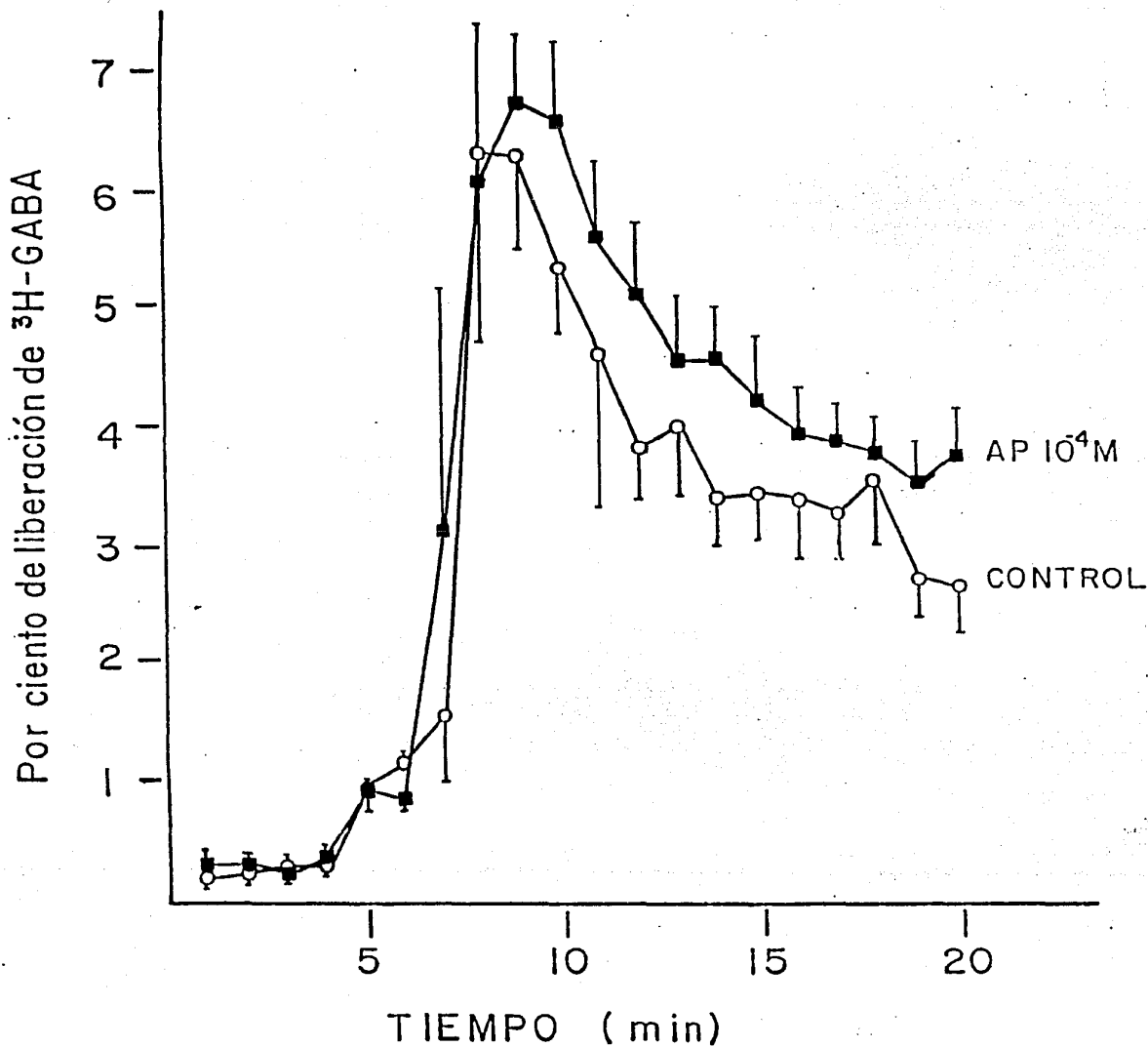


Fig. 17 Por ciento de liberación de <sup>3</sup>H-GABA por el método de superfusión en rebanadas de corteza cerebral de ratón, durante los primeros 5 minutos con un medio Krebs-Ringer normal y los siguientes 15 minutos con un medio con K<sup>+</sup> 15 mM, en presencia de Ca<sup>++</sup>. Los círculos blancos muestran la liberación proveniente de las rebanadas en condiciones control y los cuadros negros, representan la liberación proveniente de rebanadas en presencia de AP (1 X 10<sup>-4</sup> M). Los valores son  $\bar{X} \pm$  SEM de 7 experimentos.

En presencia de  $\text{Ca}^{++}$  y agregando un inhibidor preferencial de la porción glial (beta-alanina) durante la captura, y aun durante la superfusión, se determino que el aumento aparente en presencia de AP sobre el control, no es significativo (Fig. 18). Cabe hacer notar que si se compara con los resultados obtenidos en una liberación normal (Fig. 17), en este caso los niveles de 3H-GABA liberados se ven disminuidos aproximadamente en un 50%.

Por otro lado, la liberación correspondiente a la fracción glial (Fig. 19) también es cercana al 50% de la liberación normal (n=7). Nuevamente, las diferencias observadas entre la curva en presencia de ácido piperólico y la curva control, no son significativas estadísticamente. Sin embargo, a diferencia de los experimentos por incubación en estas condiciones, sí es notable una liberación máxima (de 3 y 4.2% aproximadamente para controles y para experimentos con AP), y un decaimiento a través del tiempo en ambos casos.

#### b) Liberación de 3H-GABA en ausencia de $\text{Ca}^{++}$ con alto $\text{K}^{+}$

Utilizando un medio Krebs-Ringer modificado sin  $\text{Ca}^{++}$  y con alto  $\text{K}^{+}$  como agente despolarizante, la liberación de 3H-GABA (Fig. 20) en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M), no tuvo diferencias significativas respecto a la de los controles (n=7). Los valores de 3H-GABA alcanzaron solo un 4 y un 4.5% aproximadamente como máximos, en condiciones control y en presencia de AP, respectivamente, mostrando nuevamente una dependencia parcial del  $\text{Ca}^{++}$  para la liberación de GABA.

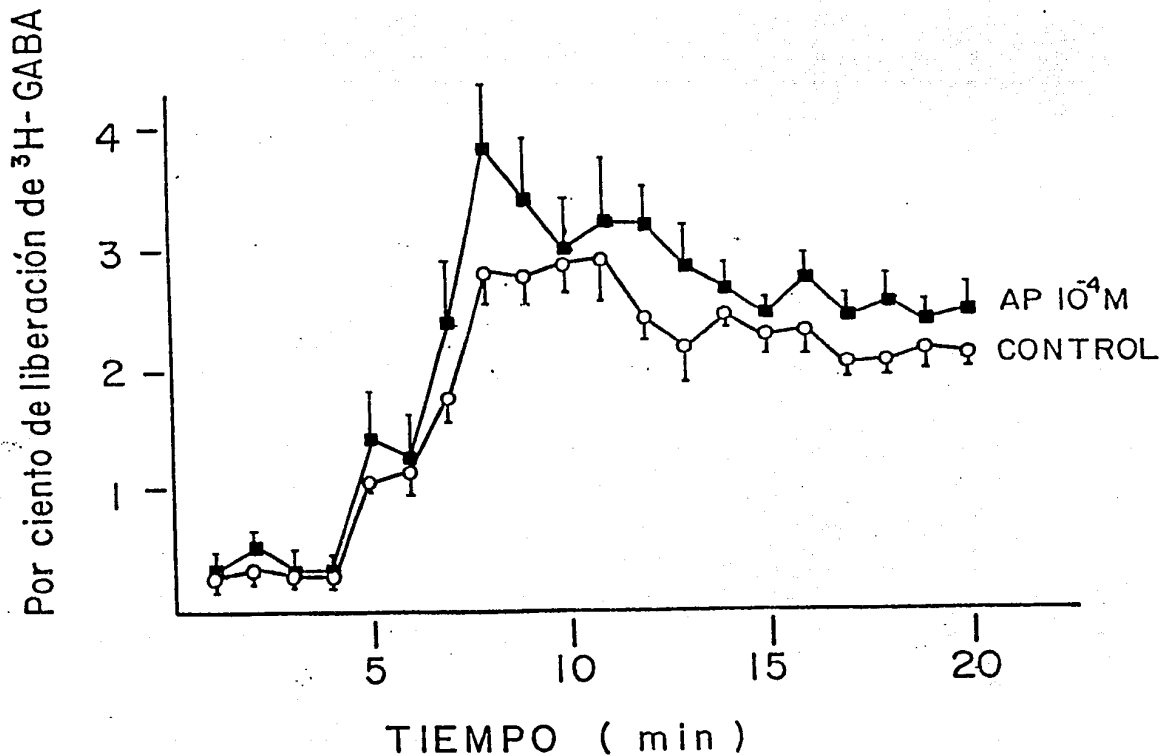


Fig. 18. Por ciento de liberación neuronal de  $^3\text{H}$ -GABA por el método de superfusión en rebanadas de corteza cerebral de ratón con un medio Krebs-Ringer normal durante los primeros 5 minutos y con un medio con  $\text{K}^+$  15 mM en los 15 minutos siguientes, en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . Los círculos blancos representan la liberación de rebanadas en condiciones control y los cuadros negros representan la liberación proveniente de rebanadas en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M). La captura se llevó a cabo en presencia de beta-alanina. Los valores son  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  de 5 experimentos

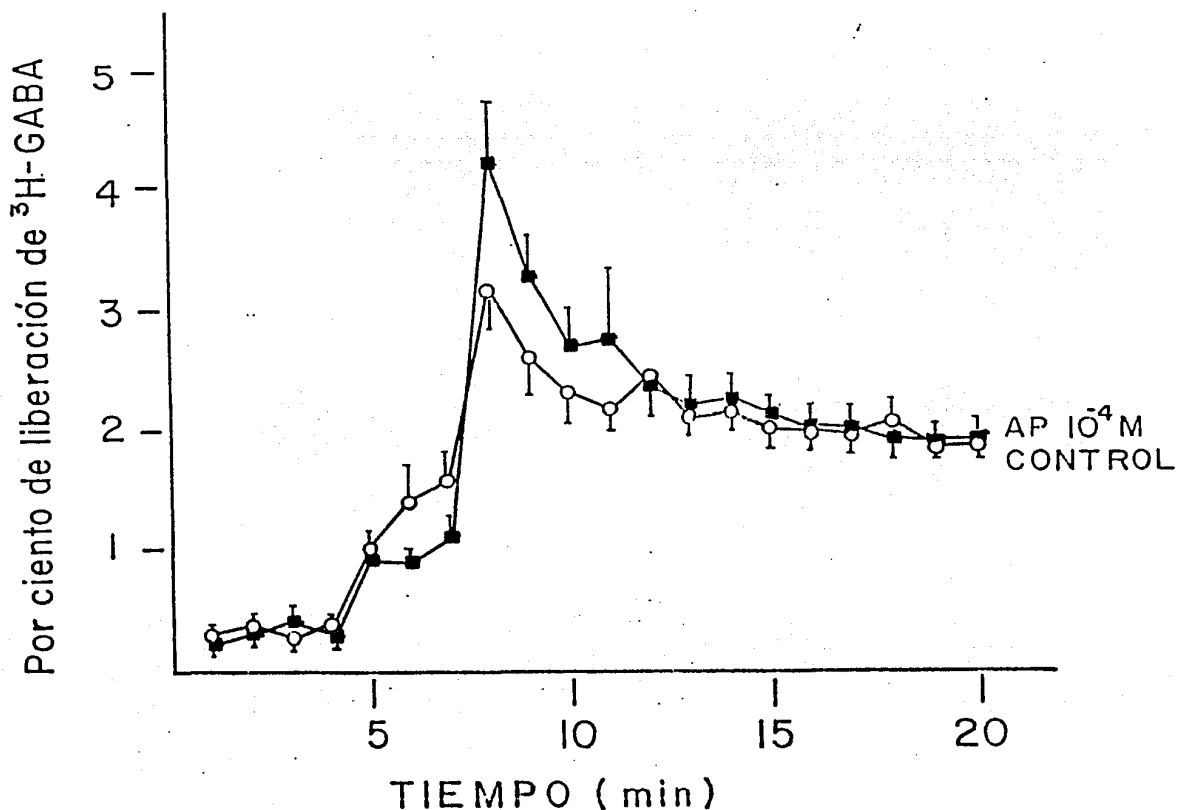


Fig. 19 Por ciento de liberación glial de 3H-GABA por el método de superfusión en rebanadas de corteza cerebral de ratón con un medio Krebs-Ringer normal en los primeros 5 minutos de superfusión y con un medio con  $K^+$  15 mM en los 15 minutos siguientes, en presencia de  $Ca^{++}$ . Los círculos blancos muestran la liberación en condiciones control y los cuadros negros, muestran la liberación proveniente de rebanadas en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M). La captura se llevó a cabo en presencia de ácido nípecóico. Los valores son  $\bar{X} \pm$  SEM de 7 experimentos.

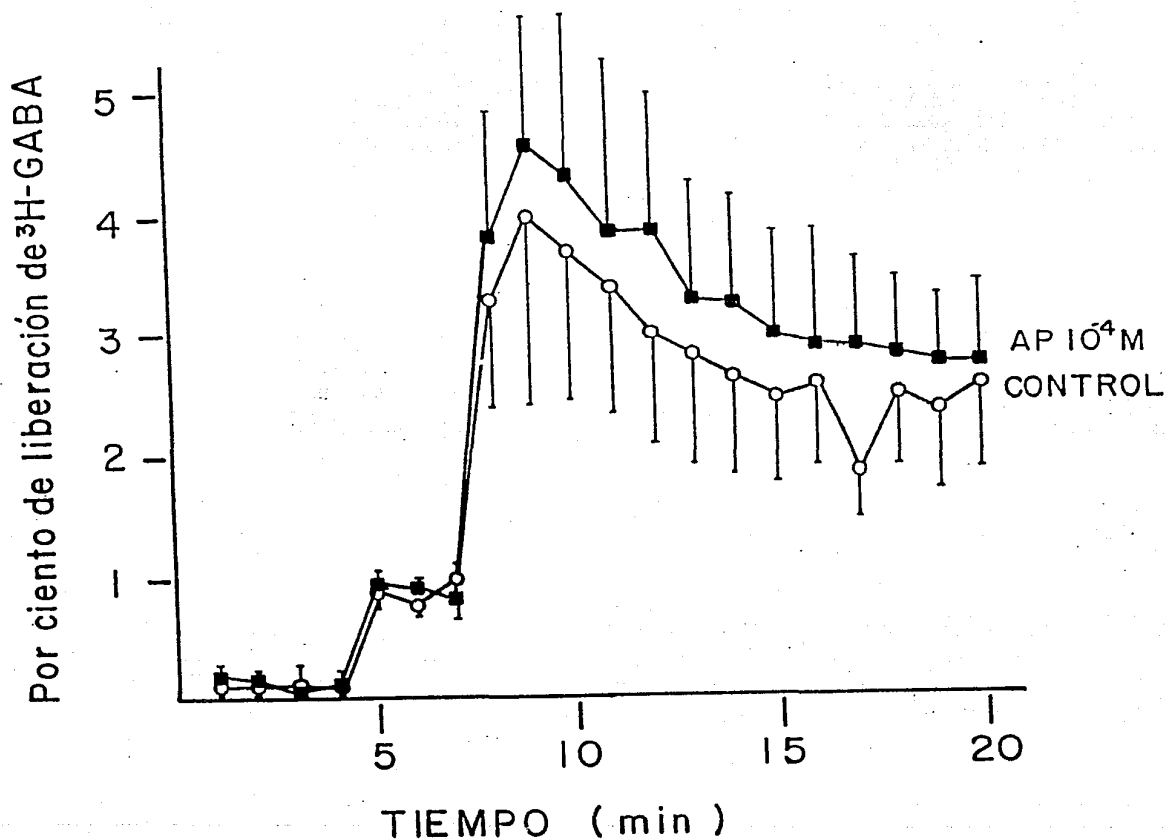


Fig. 20 Por ciento de liberación de  $^3\text{H}$ -GABA por el método de superfusión en rebanadas de corteza cerebral de ratón con un medio Krebs-Ringer normal durante los primeros 5 minutos y con un medio con  $\text{K}^+$  15 mM en los siguientes 15 minutos, en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$ . Los círculos blancos representan la liberación en condiciones control y los cuadros negros, muestran la liberación de rebanadas en presencia de AP ( $1 \times 10^{-4}$  M). Los valores son  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  de 7 experimentos.

## DISCUSION

Existen toda una serie de evidencias aportadas por diferentes investigadores durante los últimos diez años aproximadamente, que sugieren una función importante del AP en el sistema nervioso de los mamíferos. Son relevantes los trabajos de la cinética de captura (65, 74, 48), del proceso de liberación (78, 48) y de la distribución regional del AP en el cerebro de algunos mamíferos, para sugerir que este aminoácido desempeña alguna función en el sistema nervioso. Primeramente, algunos estudios "in vitro", evidenciaron que el AP podría tener interacción con el GABA (71, 77), posiblemente como un modulador de la actividad de éste. Otros estudios determinaron un efecto inhibitorio del ácido pipécolico a nivel neuronal que sugerían que la probable función tuviera lugar postsinápticamente, y en estrecha relación con la actividad GABAérgica (98, 99). Sin embargo, los trabajos que determinan el grado de unión del AP y su interacción con el receptor postsináptico a GABA aportan pruebas para rebatir que la acción moduladora del AP ocurre a nivel del receptor postsináptico.

Para el desarrollo de los experimentos cuyos resultados se muestran en la sección anterior, se consideraron básicamente algunos reportes de Nomura y col. (71, 73, 74) y de Okuma y col. (77), pues sus hallazgos apoyaron grandemente la hipótesis que propone al AP como un neuromodulador del sistema GABAérgico. Dichos investigadores emplearon rebanadas de cerebro de rata para sus experimentos de liberación de GABA (y otros neurotransmisores) mediante superfusión, y sinaptosomas o fracciones P2 para sus experimentos de captura de GABA en presencia de AP  $1 \times 10^{-4}$  M ó  $4 \times 10^{-7}$  M. Así pues, el presente trabajo se ha realizado con el objetivo primordial de demostrar si el posible papel neuromodulador del ácido pipécolico sobre la transmisión GABAérgica, ocurre a nivel presináptico, para lo cual, se utilizaron rebanadas de la corteza cerebral anterior de ratón, en tres sistemas diferentes, debido a su alto contenido de sitios de unión de AP (34).

Por un lado, se consideró un sistema que evolucione los efectos del AP únicamente sobre la captura y por otro lado, un sistema en que se excluye la recaptura y se cuantifica sólo la liberación, debido a que la rebanada es lavada constantemente con un medio nuevo a través de todo el experimento, que transcurre en 20 minutos para nuestro caso. El hecho de probar sistemas de captura y liberación por separado, nos permite saber si alguno de los dos mecanismos se encuentra mayormente involucrado en el efecto del AP. Por último, se consideró adecuado usar un tercer sistema donde se encontrasen presentes los mecanismos de liberación y recaptura (liberación por incubación), debido a que estas características implican una mayor semejanza con lo que ocurre en condiciones fisiológicas.

Preliminarmente, se realizaron experimentos de liberación inducida por  $K^+$  47 mM, en ellos se determinó, que la despolarización era casi completa y el supuesto efecto del ácido pipécolico sobre la liberación de GABA, no pudo apreciarse (datos



no mostrados). Por lo tanto, se determinó provocar una despolarización parcial con  $K^+$  15 mM y probar, también de manera preliminar, el efecto del AP en concentraciones de  $1 \times 10^{-8}$  M y  $1 \times 10^{-4}$  M, encontrándose con esta última, los efectos más claros sobre la liberación de 3H-GABA (Fig. 13).

Finalmente, se llevaron a cabo nuestros experimentos probando el efecto del AP  $1 \times 10^{-4}$  M en la captura, y en la liberación de 3H-GABA en presencia y ausencia de  $Ca^{++}$ . También se determinó evaluar los efectos del AP ( $1 \times 10^{-4}$  M), sobre la porción neuronal para lo que se empleó beta-alanina, un inhibidor específico de la captura glial de GABA (89, 92), o ácido nipescótico para evaluar la captura y liberación de 3H-GABA por células gliales, debido a que este ácido inhibe la captura de GABA a nivel neuronal (54, 13, 55, 97). Cabe aclarar que se asume que la presencia de la beta-alanina (o el ácido nipescótico) durante la superfusión, no afecta nuestros resultados, comparando con los experimentos donde el inhibidor glial se encontraba sólo en la captura. Las razones para tal suposición, se basan en que la acción inhibitoria de la beta-alanina y del ácido nipescótico, se ha detectado exclusivamente a nivel de captura de GABA y en que el método por sí mismo (superfusión), elimina la posibilidad de interacción debido a que el medio fluye constantemente.

En estas condiciones, se determinó en la captura normal de 3H-GABA, es decir, con participación neuronal y glial, una inhibición del 30 y 18% aproximadamente para incubaciones a un minuto y 5 minutos, respectivamente (Tabla 5). En las liberaciones espontáneas (Fig. 12), no se encontró efecto del AP en ninguno de los casos, inclusive en ausencia de  $Ca^{++}$ , los valores alcanzados no tuvieron diferencias entre sí.

Por otro lado, se detectó un efecto claro del AP ( $1 \times 10^{-4}$  M) sobre la liberación de 3H-GABA por incubación inducida con  $K^+$  15 mM, la cual alcanzó un incremento significativo respecto a su control. La diferencia de los reportes previos en los que se determinó un incremento significativo en la liberación de GABA en presencia de AP (73, 77), en nuestros experimentos análogos por superfusión, se encontró un aumento en presencia de AP, que no fue significativo (Fig. 17). Las diferencias entre nuestros resultados de liberación por superfusión y los obtenidos por Okuma y col. (77) en los que sí encontraron diferencias significativas, radica en que estos investigadores utilizaron rebanadas de cerebro de rata y además se provocó una despolarización completa con  $K^+$  50 mM. Estas condiciones traen consigo, diferencias en cuanto a la variabilidad de los organismos utilizados, y en relación a que el usar rebanadas de cerebro implique un traslape de los efectos del AP entre regiones distintas del cerebro.

Estas primeras observaciones de nuestros resultados podrían tener ciertas implicaciones, probablemente el incremento evaluado en nuestros experimentos de liberación por el método de incubación (Fig. 13) tendría relación con la disminución obtenida en los experimentos de captura (Tabla 5), aún cuando éste no sea significativo estadísticamente. Por otro lado, lo anterior indica que el efecto del AP es más evidente cuando interacciona por mecanismos presinápticos de liberación y recaptura. Así mismo, este aumento apoyaría y explicaría, al menos parcialmente, los

hallazgos de Takahama y col. quienes determinaron en estudios electrofisiológicos en neuronas de corteza cerebral y de hipocampo de rata, una estimulación de las acciones inhibitorias del GABA en presencia de AP (29).

Los experimentos de captura neuronal de 3H-GABA, es decir, en presencia de beta-alanina, mostraron una inhibición similar (menor del 40%), aunque significativa sólo a los 5 minutos de incubación (Tabla 5). Esta disminución en la captura en presencia de AP podría reflejarse también en los experimentos de liberación por incubación de rebanadas que captaron en presencia de beta-alanina, en los que el GABA liberado al medio es incrementado significativamente en un 150% respecto al control (Fig. 14). En cambio, en el sistema donde solo se considera el efecto sobre la liberación, el AP no ejerció un efecto importante (Fig. 18).

Al realizar los experimentos complementarios donde se efectuó la captura de 3H-GABA en presencia de ácido nípecótico, esto es, la captura por células gliales, no se encontró inhibición como en los casos anteriores. Por el contrario, a un minuto, la captura en presencia de AP se incrementó un 46% y a los 5 minutos en un 18%, respecto a los controles correspondientes (Tabla 5), en ambos casos estas diferencias resultaron no significativas. A su vez, estos resultados podrían tener relación con el hecho de que en la liberación por la técnica de incubación donde se usó ácido nípecótico durante la captura, no se observó una liberación neta (Fig. 15) probablemente debido a que el ácido nípecótico aumenta la recaptura de 3H-GABA por células gliales (Tabla 5). Por otra parte, las diferencias en la liberación por superfusión con ácido nípecótico (liberación proveniente de células gliales) no fueron significativas (Fig. 19), lo cual sugiere que el AP no está afectando al mecanismo de liberación aisladamente. No obstante, lo sobresaliente de estos datos es que hay una liberación importante proveniente de células gliales lo cual es congruente con la observación de que la glía capta GABA con una alta afinidad.

En ausencia de  $Ca^{++}$  no se determinó efecto alguno del AP sobre la liberación de 3H-GABA por los métodos de incubación (Fig. 16) y superfusión (Fig. 20), lo que tal vez sea un indicio de que este aminoácido ejerce su efecto únicamente sobre la liberación de GABA dependiente de  $Ca^{++}$ . Sin embargo, estos resultados son importantes debido a que prueban nuevamente la dependencia parcial de  $Ca^{++}$  de la liberación de GABA reportada previamente, pues en todos los casos se observa de manera consistente, una disminución de los niveles liberados, pero nunca de manera total.

Globalmente, nuestros resultados indican algunas posibilidades importantes. En primera instancia, que el AP ejerza su acción moduladora en la corteza cerebral de ratón a nivel presináptico, solo cuando actúan combinadamente los mecanismos de liberación y recaptura, debido a que se encontró significancia exclusivamente en experimentos donde se utilizó la técnica de liberación por incubación. Probablemente este hecho implicaría un efecto del AP de naturaleza sinérgica, es decir, que dicho efecto es mayor cuando se encuentran interactuando los mecanismos presinápticos de liberación y recaptura (que sería el caso en

condiciones fisiológicas), que cuando actúan separadamente. En segunda instancia, puede sugerirse que la mayor participación en el efecto presináptico del AP, corresponde a la acción neuronal, debido a que la liberación de 3H-GABA, previa captura en presencia de beta-alanina, donde se excluye en gran parte la captación glial, mostró diferencias significativas representadas por un aumento en la liberación de 3H-GABA en presencia de AP respecto al control. Aunado a lo anterior, al parecer el AP podría tener un efecto a nivel de captación glial, dado que esta se vio aumentada, de tal forma que la liberación fue nula en los experimentos por incubación, y no significativa en los realizados por superfusión, aunque en estos últimos la liberación glial fue bastante evidente (Fig. 19).

Ubicando nuestros resultados en el contexto de la posible función moduladora del AP a nivel presináptico, consideramos que señalan hacia la confirmación de esta hipótesis. Restaría así mismo, establecer si el AP tiene un rango de acción amplio entre los mamíferos y aún en otros vertebrados. Además, como un objetivo posterior a este trabajo, sería interesante tratar de dilucidar el mecanismo por el que el AP realiza una función moduladora de la transmisión GABAérgica, tal vez a nivel de algún receptor presináptico como el recientemente descrito GABA-E.

## CONCLUSIONES

- 1) La liberación de 3H-GABA, es parcialmente dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ .
- 2) Las células gliales liberan niveles importantes de 3H-GABA.
- 3) El ácido pipecólico no ejerce ningún efecto sobre la liberación espontánea de 3H-GABA, ni en la liberación de 3H-GABA no dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ .
- 4) El ácido pipecólico afecta la acción combinada de los mecanismos de liberación y recaptura de 3H-GABA en la corteza cerebral de ratón, en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ .
- 5) El efecto del ácido pipecólico a nivel presináptico incide en mayor grado en la porción neuronal.
- 6) El ácido pipecólico puede sugerirse como modulador presináptico de la actividad GABAérgica, en la corteza cerebral de el ratón.

## REFERENCIAS

- 1) Allman, D. (1985). Tuning in to neurotransmitters. Nature 315: 537.
- 2) Ambrose, K.Ch., Chang, Y.F. and Myslinski N.R. (1983). Brain Blood Barrier of L-Pipecolic Acid in various rat brain regions. Neurochem. Res. 8: 1087-1096
- 3) Archibald, J.T. and White, T.D. (1974). Rapid reversal of internal Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> of synaptosomes by ouabain. Nature 255: 595-596.
- 4) Arneson, D.W., PhD; Tipton, R.E., M.D; and Ward, J.C, M.D., PhD. (1982) Hyperpipecolic Acidemia. Occurrence in an infant with clinical findings of the cerebrohepatorenal (Zellweger) syndrome. Arch. Neurol. 39: 713-716.
- 5) Asopara, J., Landua, A.J., Fuerst, R. and Seale, B. (1950). Free gamma-aminobutyric acid in brain. J. Biol. Chem. 187: 35-39.
- 6) Bloom, F.E. (1978). Is There a Neurotransmitter Code in the Brain? In Psychopharmacology: A 20 Year Progress Report. Ed. by Lipton, M.E., Killam, K.C. and Mascal, A. NY Raven Press. pp. 205-213.
- 7) Bowen, P., Lee, C.C.N., Zellger, H. and Lindberg, R. (1962). Bull. Johns Hopkins Hosp. 114: 402-414. Citado en ref. 33).
- 8) Sowers, N.G., Hill, D.R., Hudson, A.L., Shaw, J.S. and Turnbull, M.J. (1979). Baclofen: a selective agonist for a novel type of GABA receptor. Br. J. Pharmac. 67: 444e.
- 9) Sowers, N.G., Hill, D.R., Hudson, A.L., Doble, A., Midlemis, D.N., Shaw, J. and Turnbull, M.J. (1980). (-) Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. Nature, Lond. 283: 92-94.
- 10) Sowers, N.G., Doble, A., Hill, D.R., Hudson, A.L., Shaw, J.S., Turnbull, M.J. and Warrington, R. (1981). Bicuculline-insensitive GABA receptors on peripheral autonomic nerve terminals. Eur. J. Pharmac. 71: 53-70.
- 11) Sowers, N.G. (1983). Baclofen: 10 years on. Trends. Pharm. Sci. 3: 400-403.
- 12) Sowers, N.G., Hill, D.R. and Hudson, A.L. (1983). Characteristics of GABA-B receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. Br. J. Pharmacol. 78 o 73: 191-206.
- 13) Braham, L., Krogsgaard-Larsen, P. and Jacobsen, P. (1978). GABA Neurotransmitters, eds. Krogsgaard-Larsen, P., Scheel-Kruger, J. and Kofed, H. Copenhagen: Munksgaard. pp. 247-263.

14) Brown, H. (1976). Brain & Behavior. A Textbook of Physiological Psychology. Oxford University Press, Inc. USA. 413pp.

15) Cajal, S.R. (1894). La fine structure des centres nerveux. Proc. R. Soc. Lond. 55: 444-468.

16) Chang, Y.F., Pipecolic acid pathway: (1976). Pipecolic acid pathway: the mayor lysine metabolic route in the rat brain. Biochim. Biophys. Res. Commun. 69: 174-180.

17) Chang, Y.F. (1978). Lysine metabolism in the rat brain: blood-barrier transport formation of PA and human hyperpipecolatemia. J. Neurochem. 30: 355-360.

18) Chang, Y.F. (1982). Lysine metabolism in the human and the monkey: Demonstration of pipecolic acid formation in the brain and other organs. Neurochem. Res. 7: 577-588.

19) Cooper, J.R., Bloom, F.E. and Roth, R.H. (1978). The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Oxford University Press. 3rd. Ed. USA. 327pp.

20) Cotman, C.W., Haycock, J.R. and White, W.F. (1976). Stimulus-secretion coupling processes in brain: analysis of noradrenaline and gamma-aminobutyric acid release. J. Physiol. (Lond), 254: 475-505.

21) Bancis, J. and Nutzler, J. (1981). The metabolism of D- and L-pipecolic acid in the rabbit and rat. Biochim. et Biophys. Acta. 675: 411-415.

22) Davidson, N. (1976). Neurotransmitter Amino acids. Academic Press Inc. (London), Ltd. Antrim, Northern Ireland. 179 pp.

23) DeBelleruche, J.S. and Bradford, H.F. (1972). Metabolism of beds of mammalian cortical synaptosomes: response to depolarizing influences. J. Neurochem. 19: 585-602.

24) De Robertis, E.M.F. y De Robertis, E.M.F. (1985). Biologia Celular y Molecular. Edit. El Atenco. Buenos Aires. Argentina. 618 pp.

25) Ehrlich, P. (1900). On immunity with special reference to cell life. Croonian Lecture Proc. R. Soc. Lond. 66: 424-448.

26) Erdo, S.L. (1985). Peripheral GABAergic mechanisms. Trends in Pharmacological Sciences. 6: 205-208.

27) Florey, E. (1967). Neurotransmitters and Modulators in the Animal Kingdom. Fed. Proc. 26: 1164-1167.

28) Gerweg, G., von Rehren, D. and Hintze, V. (1980). L-Pipecolate formation in the mammalian brain. Regional

distribution of delta 1-pyrroline 2-carboxylate-reductase activity. J. of Neurochem. 35: 616-621.

29) Gaffield, P.D., Toller, E., Hinton, G.G., Wallace, A.C., Abdelincour, G.H. and Haust, M.D. (1968). Hyperpipicolatemia: a new metabolic disorder associated with neuropathy and hepatomegaly. Can. Med. Assoc. J. 221 p.1215.

30) Gaffield, P.D. and Toller, E. (1971). Accumulation of lysine dipeptides in the brain in hyperpipicolatemia. Brain Res. 22: 170-174.

31) Giacobini, E., Nomura, Y. and Schmidt-Glenewinkel, T. (1980). Pipecolic acid: Origin, biosynthesis and metabolism in the brain. Cell. Mol. Biol. 26: 135-146.

32) Giacobini, E. (1983). Iminoacids of the brain. Handbook of Neurochemistry. Vol 3. 2n. Ed. (Plenum Publishing Corporation).

33) Giacobini, E. and Gutierrez, M.C. (1983). GABA and pipecolic acid, a possible reciprocal modulation in the central nervous system. Glutamine, Glutamate and GABA in the central Nervous System. pp. 571-580.

34) Gutiérrez, H.C. and Giacobini, E. (1985). Identification and characterization of pipecolic acid binding sites in mouse brain. Neurochem. Res. Vol. 10: No. 5. 691-702.

35) Hernandez, M.F. and Chang, Y.F. (1980). In vitro synthesis of L-pipecolate from L-lysine: Inconsistent with E-N-acetyl-L-lysine as an obligatory intermediate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 93: 762-767.

36) Higashino, K., Fukuda, K. and Lieberman, I. (1965). Saccharopine, a product of lysine breakdown by mammalian liver. Biochim. Biophys. Res. Commun. 20: p.285.

37) Higashino, K., Fujioaka, M. and Yamamura, Y. (1971). The conversion of L-lysine to saccharopine and alpha-aminoadipate in mouse. Archs. Biochem. Biophys. 142: 606-614.

38) Hill, D.R. and Bowery, N.G. (1981). 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA-B sites in rat brain. Nature. 290: 149-152.

39) Hutzler, J., and Dancis, J. (1968). Conversion of lysine to saccharopine by human tissues. Biochim. Biophys. Acta. 158: 62-69.

40) Inoue, M., Matsuo, T., and Ogata, N. (1985). Possible involvement of K<sup>+</sup> conductance in the action of gamma-aminobutyric acid in the guinea pig hippocampus. Br. J. Pharmacol. 86 (2): 515-524.

- 41) Johnston, G.A.R., Stephanson, A.L., Twitchen, B. (1976). Uptake and release of piperidic acid by rat brain slices. J. Neurochem. 26: 83.
- 42) Johnston, G.A.R. (1977). Effects of calcium on the potassium-stimulated release of radioactive beta-alanine and gamma-aminobutyric acid from slices of rat cerebral cortex and spinal cord. Brain Res. 121: 179-181.
- 43) Johnston, G.A.R. and Allan, R.D. (1984). GABA Agonists. Neuropharmacology, 23: 831-832.
- 44) Kandel, E.R. and Schwartz, J.H. (1985). Principles of Neural Sciences. Elsevier Science Publishing Co. Inc. U.S.A. 979 pp.
- 45) Kasá, Y., Kataoka, M., and Miyata, T. (1967). In vitro production of piperidine from pipercolic acid in the presence of brain tissue. Life Sci. 6: 2427-2431.
- 46) Kasá, Y., Okano, Y., Yamanishi, Y., Kataoka, M., Kitahara, K. and Miyata, T. (1970). In vivo production of piperidine from pipercolic acid in the rat. Life Sci. 9: 1331-1337.
- 47) Kasá, Y., Kataoka, M., Miyata, T. and Okano, Y. (1973). Pipercolic acid in the dog brain. Life Sci. 13: 867-873.
- 48) Kasá, Y., Miyata, T., Miyata, A., Morimoto, H., Okano, Y. and Takahama, K. (1980). Pharmacological studies on alycyclic amines XXVI: Uptake and release of piperidine and pipercolic acid in the brain slices. Folia Pharmacol. (Jap.), 76: 68.
- 49) Kasá, Y., Takahama, K., Hashimoto, T., Kaisaku, J., Okano, Y. and Miyata, T. (1980). Electrophoretic study of pipercolic acid, a biogenic iminoacid in the mammalian brain. Brain Res. 193: 603-608.
- 50) Katz, B. (1969). The release of neural transmitter substance. Liverpool: Liverpool University Press.
- 51) Katz, R.L., Chase, T.N., and Kopin, I.D. (1969). Effect of ions on stimulus-induced release of amino acids from mammalian brain slices. J. Neurochem. 16: 961-967.
- 52) Kim, J.S. and Giacobini, E. (1984). Quantitative determination and regional distribution of pipercolic acid in rodent brain. Neurochem. Res. 9: 1559-1569.
- 53) Kim, J.S. and Giacobini, E. (1985). Pipercolic acid levels and transport in developing mouse brain. Dev. Brain Res. 22: 181-186.
- 54) Kroegsgaard-Larsen, P. and Johnston, G.A.R. (1975). Inhibition of GABA uptake in rat brain slices by pipercolic acid, various isoxasoles and related compounds. J. Neurochem. 25: 797-802.



- 55) Krogsgaard-Larsen, P. (1980). Inhibitors of the GABA uptake systems. Moll. Cell. Biochem. 31: 105-121.
- 56) Kuno, H. and Weakly, J.N. (1972a). Facilitation of postsynaptic excitatory synaptic potentials in spinal motoneurons evoked by internuncial impulses. J. Physiol. 224: 271-286.
- 57) Kuno, H. and Weakly, J.N. (1972b). Quantal components of the inhibitory synaptic potential in spinal motoneurons of the cat. J. Physiol. 224: 287-303.
- 58) Kupfermann, I. (1979). Modulatory actions of neurotransmitters. Ann. Rev. Neurosci. 2: 447-465.
- 59) Kuriyama, K., Roberts, E. and Kafakuda, T. (1968). Association of the gamma-aminobutyric acid system with a synaptic vesicle fraction from mouse brain. Brain Res. 8: 132-152.
- 60) Kuriyama, K., Roberts, E. and Vos, J. (1968). Uptake of gamma-aminobutyric acid by mitochondrial and synaptosomal fractions from mouse brain. Brain Res. 16: 479-492.
- 61) Levy, S.G. (1968). Inferential Statistics in the Behavioral Sciences. Holt, Rinehart and Winston, Inc. USA. 267 pp.
- 62) López-Colomé, A.N., Tapia, R., Salceda, R. and Pasantes-Morales, H. (1979). K<sup>+</sup>-stimulated release of labeled gamma-aminobutyrate, glycine and taurine in slices of several regions of rat central nervous system. Neuroscience. 3: 1069-1074.
- 63) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.N., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-267.
- 64) Mangan, J.L. and Whittaker, V.P. (1966). The distribution of free amino acids in subcellular fractions of guinea pig brain. Biochem. J. 28: 128-137.
- 65) Neek, J.L. (1974). Uptake and metabolism of piperidine and pipercolic acid in brain. Fed. Proc. 33: 468p.
- 66) Meister, A. (1965). Aminoacids. Vol. 2, pp. 941-951. Academic Press, New York.
- 67) Morrison, R. I. (1953). The isolation of L-pipercolic acid from Trifolium repens. Biochem. J. 53: 474.
- 68) Mulder, A.H. and Snyder, S.H. (1974). Potassium-induced release of amino acids from cerebral cortex and spinal cord slices of the rat. Brain Res. 74: 297-308.
- 69) Nicoll, R.A. and Newberry, N. R. (1984). A possible postsynaptic inhibitory action for GABA-B receptors on hippocampal pyramidal cells. Neuropharmacology. 23: pp. 849-850.

- 70) Nishio, H., Ortiz, J., and Giacobini, E. (1981). Accumulation and metabolism of pipercolic acid in the brain and other organs of the mouse. Neurochem. Res. 6: 1241-1252.
- 71) Nomura, Y., Okuma, Y., and Segawa, T. (1978). Influence of piperidin and pipercolic acid on the uptake of monoamines, GABA and glycine into P2 fractions of the rat brain and the spinal cord. J. Pharm. Dyn. 1: 251-255.
- 72) Nomura, Y., Schmidt-Glenewinkel, T. and Giacobini, E. (1978). In vitro formation of piperidine, cadaverine and pipercolic acid in chick and mouse brain during development. Exp. Neurosci. 1: 237-249.
- 73) Nomura, Y., Okuma, Y., Segawa, T., Schmidt-Glenewinkel, T., and Giacobini, E. (1979). A calcium dependent, high potassium induced release of pipercolic acid from rat brain slices. J. Neurochem. 33: 803-805.
- 74) Nomura, Y., Schmidt-Glenewinkel, T. and Giacobini, E. (1980). Uptake of piperidine and pipercolic acid by synaptosomes from mouse brain. Neurochem. Res. 5: 1163-1173.
- 75) Nomura, Y., Okuma, Y., Segawa, T., Schmidt-Glenewinkel, T. and Giacobini, E. (1981). Comparison of synaptosomal and glial uptake of pipercolic acid and GABA in rat brain. Neurochem. Res. 6: 391-400.
- 76) Okano, Y., Kadota, F., Nagata, J., Matsuda, A., Ijima, S., Takahama, K., and Miyata, T. (1984). Quantification by selected ion monitoring of pipercolic acid, prolin, -GABA and glycine in rat brain. J. Chromatogr. 310: 251-257.
- 77) Okuma, Y., Nomura, T. and Segawa, T. (1979). The effect of piperidine and pipercolic acid on high potassium-induced release of noradrenaline, serotonin and GABA from rat brain slices. J. Pharm. Dyn. 2: 261-265.
- 78) Polc, P., Bonetti, E.P., Schaffner, R. and Haefely, W. (1982). A three state model of the benzodiazepine receptor explains the interaction between the benzodiazepine antagonist Ro 15-1783, benzodiazepine tranquilizers, beta carbolines, and phenobarbitone. Naunyn-Schmiedeberg, Arch. Pharmacol. 321: 200-264.
- 79) Post, R.M., Gold, P., Rabinow, D.R., Bellenger, J.C., Bunney, W.E. Jr., Goodwin, F.K. (1982). Peptides in the cerebrospinal fluid of neuropsychiatric patients: an approach to Central Nervous System. Peptide Function. 31: 1-15.
- 80) Rassin, D.K. (1972). Amino acids as putative transmitters: failure to bind to synaptic vesicles of guinea pig cerebral cortex. J. Neurochem. 19: 139-148.

- 81) Roberts, L. and Frankel, S. (1950). Gamma-aminobutyric acid in brain: Its formation from glutamic acid. J. Biol. Chem. **187**: 55-63.
- 82) Roberts, J.F. and Shariif, N.A. (1978). Effects of L-glutamate and related amino acids upon the release of 3H-dopamine from rat striatal slices. Brain Res. **157**: 391-395.
- 83) Rothstein, M. and Miller, L. L. (1953). The conversion of L-lysine 6-14C to pipercolic acid in the rat. J. Am. Chem. Soc. **75**: 4371-4372.
- 84) Rothstein, M. and Miller, L. L. (1954). The metabolism of L-lysine 6-14-C. J. Biol. Chem. **206**: 243-253.
- 85) Sandoval, M. E. y Lara, R. (1983). "Propiedades Generales de la Transmisión Sináptica". En Pasantes-Morales, H. y Aréchiga, H. Aminoácidos y Péptidos en la Integración de Funciones Nerviosas. UNAM. pp. 17-27.
- 86) Schadé, J.F. y Ford, D. H. (1976). Neurología Básica. Edit. El Manual Moderno, S.A. México, D.F.
- 87) Schmidt-Glenewinkel, T., Nomura, and Giacobini, E. (1977). The conversion of lysine to piperidine, cadaverine and pipercolic acid in the brain and other organs of the mouse. Neurochem. Res. **2**: 619-637.
- 88) Schmidt-Glenewinkel, T., Giacobini, E., Nomura, Y., Okuma, Y. and Segawa, T. (1978). Presence, metabolism and uptake of pipercolic acid in the mouse brain. Proc. Eur. Soc. Neurochem. Vol. 1, Neuhoff V., ed.) p. 618. Verlag Chemie, Weinheim and New York.
- 89) Schon, F. and Kelly, J.S. (1975). Selective uptake of 3H-beta-alanine by glia associated with the glial uptake systems for GABA. Brain Res. **96**: 243-257.
- 90) Shain, W. and Carpenter, D.O. (1981). Mechanisms of Synaptic Modulation. International Review of Neurobiology **22**: 205-245.
- 91) Sherrington, C.S. (1947). The Integrative Action of the Nervous System. 2nd. ed. New Haven: Yale University Press.
- 92) Siegel, G.J., Albers, R.W., Agranoff, B.W. and Katzman, R. (1981). Basic Neurochemistry. Little, Brown and Company Boston, USA. 3rd. edition. 857 pp.
- 93) Simmonds, M.A. (1983). Multiple GABA receptors and associated regulatory sites. TINS. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam 0878.
- 94) Snyder, S.H. (1980). Brain Peptides as Neurotransmitters. Science **209**: 976-983.

- 95) Sonoda, Y. (1957). Proc. Japan Acad. 31: 182. (Citado en ref. 92).
- 96) Srinivasan, V., Neal, H.D. and Mitchell, J.F. (1969). The effect of electrical stimulation and high potassium concentrations on the efflux of 3H-gamma aminobutyric acid from brain slices. J. Neurochem. 14: 1235-1244.
- 97) Szerb, J.C. (1982). Effect of nipecotic acid, a gamma aminobutyric acid transport inhibitor on the turnover and release of gamma-aminobutyric acid in rat cortical slices. J. Neurochem. 39: 850-857.
- 98) Takahama, K., Miyata, T., Hashimoto, T., Okano, Y., Hitoshi, T. and Kasé, Y. (1982). Pipecolic acid: a new type of alpha amino acid possessing bicuculline-sensitive action in the mammalian brain. Brain Res. 232: 294-298.
- 99) Takahama, K., Hashimoto, T., Wang, M.W., Akaike, N., Hitoshi, T., Okano, Y., Kasé, Y. and Miyata, T. (1986). Pipecolic acid enhancement of GABA response in single neurons of rat brain. Neuropharmacology 25 (3): 339-342.
- 100) Tapia, R. (1983). "Neurociencias". En Peña, A. (1983). La Biología Contemporánea. UNAM, pp. 185-202.
- 101) Tapia, R. (1983). "El Ácido Gamma-aminobutírico". En Pasantes-Horales, H. y Aréchiga, H. Aminoácidos y Peptidos en la Integración de Funciones Nerviosas. UNAM, pp. 57-70.
- 102) Tapia, R. (1985). Effects of drugs on neurotransmitter release: experiment in vivo and in vitro. Neuroscience & Behavioral Reviews 2: 391-397.
- 103) Thomas, G.H., Haslam, R.H.A., Batschaw, M.L., Capute, A.L., Neidengard, L. and Ransom, J.L. (1975). Hyperpipecolic acidemia associated with hepatomegaly, mental retardation, optic nerve dysplasia and progressive neurological disease. Clin. Genet. 8: 376.
- 104) Venkata, R., Challa, M.D., Kim, R., Seisinger, H.D., Barbara, K. and Button, M.D. (1983). Pathologic alterations in the brain and liver in hyperpipecolic acidemia. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 42: 627-638.
- 105) Villeg, C.A. (1985). Biología. Nueva Editorial Interamericana, México. 303 pp.
- 106) Werman, R. (1964). Criteria for identification of central nervous system transmitter. Comp. Biochem. Physiol. 18: 745-766.
- 107) Whitehead, R.G. (1964). An unidentified compound in the serum of children with kwashiorkor (protein-calorie malnutrition). Nature 204: 389.

108) Woody, H.C. and Pupena, H.E. (1970). Excretion of pipercolic acid by infants and by patients with hyperlysinemia. Pediat. Res. 1: 89-95.

109) Zacharias, R.M., Thompson, J.F. and Steward, F. C. (1952). The detection, isolation and identification of (-) pipercolic acid as a constituent of plants. J. Am. Chem. Soc. 74: 2949-2950.