

La abstinencia al GABA: 20 años de un modelo de hiperexcitabilidad neuronal

Eduardo Calixto¹

Artículo original

SUMMARY

The sudden interruption of increase in the concentration of the synaptic cleft of the inhibitory neurotransmitter in the cerebral cortex, the γ -amino butyric acid (GABA), determines an increase in the neuronal activity. GABA withdrawal is a heuristic analogy with withdrawal symptoms developed by other GABA receptor-agonists such as benzodiazepines, barbiturates, neurosteroids and alcohol.

GABA withdrawal is a model of neuronal hyperexcitability in complete animal validated by EEG, in which complex spikes-wide of high-frequency and amplitude appear. In brain slices, GABA withdrawal was identified by increased firing synchronization of pyramidal neurons and by changes in the active properties of the neuronal membrane.

The increase in neuronal excitability of this model is the result of dynamic changes in consecutive pre- and post-synaptic components such as: a) the decrease in the synthesis/release of GABA; b) the decrease in the expression and composition of GABA_A receptors associated with increased calcium entry into the cell.

This model is an excellent bioassay to study partial epilepsy, epilepsy refractory to drug treatment and a model to reverse or prevent the generation of abstinence from different drugs.

Key words: GABA, hyperexcitability, withdrawal.

RESUMEN

La interrupción abrupta del incremento de la concentración en el espacio sináptico del neurotransmisor inhibitorio de la corteza cerebral, el ácido γ -amino butírico (GABA), condiciona un incremento en la actividad de las neuronas. La abstinencia al GABA es una analogía heurística con los síndromes de abstinencia desarrollados por otros agonistas del receptor GABA_A como: las benzodiazepinas, los barbitúricos, los neuroesteroides y el alcohol.

La abstinencia a GABA es un modelo de hiperexcitabilidad neuronal validado en animal íntegro por medio del EEG, en el cual aparecen complejos espigas-onda de amplia frecuencia y amplitud. En rebanadas de cerebro se identifica por incremento en la sincronización de disparo de neuronas piramidales y por cambios en las propiedades activas de la membrana neuronal.

El incremento de la excitabilidad neuronal de este modelo es la consecuencia de cambios dinámicos y consecutivos en los componentes presinápticos y postsinápticos como son: a) la disminución en la síntesis/liberación de GABA; b) la disminución en la expresión y la composición de receptores GABA_A asociado al incremento en la entrada de calcio a la célula.

Este modelo es un excelente bioensayo para estudiar epilepsias parciales, epilepsias refractarias a tratamiento farmacológico y un modelo para revertir o prevenir la generación de la abstinencia de diferentes drogas.

Palabras clave: GABA, hiperexcitabilidad, abstinencia.

EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A GABA EN ANIMAL ÍNTEGRO

En el curso de una investigación que estudiaba la relación entre el GABA y la epilepsia (en el laboratorio de fisiología del Sistema Nervioso en Gif-sur-Yvette, Essone, Francia, a cargo del doctor R. Naquet), se logró cuantificar un fenómeno de hiperexcitabilidad cortical consecutivo al tratamiento crónico y retiro de la administración de GABA. El objetivo era identificar estrategias para el manejo de las crisis convulsivas, en un modelo de epilepsia refleja generalizada de

origen genético, el cual es característico del mandril *Papio papio*, fotosensible, es decir, en estos animales la estimulación luminosa intermitente induce la aparición de descargas epilépticas a nivel de la corteza cerebral y de mioclonías generalizadas.^{1,2} La infusión directa de GABA en la corteza fue capaz de provocar un potente efecto anticonvulsivo, el cual perdura a todo lo largo de la infusión.^{2,3} Sin embargo, al día siguiente de haber cesado la instilación intracortical de GABA, en todos los monos se constató electroencefalográficamente la aparición de focos de actividad paroxística en los sitios de infusión (figura 1A).

¹ Departamento de Neurobiología. Dirección de Investigaciones en Neurociencias. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Correspondencia: Eduardo Calixto. INPRFM. Calzada México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370 México, DF. Tel. 4160-5089. Fax: 5655-9980. E-mail: ecalixto@imp.edu.mx

Independientemente del área infundida y de la cánula de infusión utilizada, el electrodo de registro mostraba la presencia de poliespigas y de actividades en forma de espiga-onda, que en el caso de la corteza motora se correlacionaba con la aparición de mioclonías de las porciones distales del miembro inferior, es decir, apareció una actividad epileptiforme independiente de la que el mandril tenía previamente al tratamiento.^{1,3,4} Cuatro años más tarde, se identificó la inducción de hiperexcitabilidad neuronal por abstinencia de GABA en la rata epiléptica por *kindling* de la amígdala cerebral y en la rata no epiléptica. En estos mamíferos pequeños se logró caracterizar conductual y electroencefalográficamente el fenómeno.^{5,6} Esto motivó que en lo subsiguiente, el modelo se trabajara en ratas en las que se han obtenido la gran mayoría de los datos y se ha estudiado la fenomenología de los cambios sinápticos (figura 1B).^{3,5}

MODIFICACIONES DE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA EN LA ABSTINENCIA AL GABA

Estudios con marcaje radioactivo permitieron identificar cambios metabólicos en el sitio de instilación del GABA y en estructuras subcorticales conectadas a distancia con el sitio de hiperactividad neuronal producida por la abstinencia al GABA. Mediante la técnica de la captura/metabolismo de la 2-desoxiglucosa (2-DG) radioactiva se logró cuantificar un aumento significativo en el consumo local de glucosa (tres a cinco veces en relación con el control) del área cortical involucrada en la generación de actividad paroxística y también de la zona talámica ipsilateral de proyección de dicha área cortical (núcleos posterior oralis, ventro-postero-lateral, central-lateral, ventro-lateral y reticular) en cerebros de ratas obtenidos 60 min. después de haberse retirado el GABA. Estas regiones con incremento de la actividad metabólica oxidativa corresponden con las áreas de gliosis-reactiva identificadas en los cerebros de animales obtenidos 10 días después de haberse interrumpido la actividad paroxística.⁷ Estos aspectos son semejantes a los que se suscitan en la epilepsia del lóbulo temporal y en la abstinencia inducida por el flunitrazepam o por el alcohol.⁸⁻¹⁰

En investigaciones subsiguientes se identificaron los efectos de las infusiones crónicas intracorticales del aminoácido sobre la actividad de la enzima de síntesis del GABA, la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, por sus siglas en inglés). Los resultados mostraron una reducción de 40% en la actividad de la GAD, a nivel del sitio de infusión del aminoácido.¹¹ Este evento se asemeja a lo cuantificado en la ingesta aguda de alcohol y en las abstinencias por clonazepam.^{10,12}

¿Qué receptores GABAérgicos están involucrados en este fenómeno de hiperexcitabilidad? Experimentos enfocados a determinar el papel de los dos principales subtipos de receptor que tiene el GABA, el GABA_A y el GABA_B, indica-

ron que la abstinencia al GABA es un fenómeno dependiente de los receptores ionotrópicos, es decir, los GABA_A. Las pruebas que apoyan esta afirmación son farmacológicas: por una parte, la demostración de que es posible inducir un síndrome de abstinencia al GABA empleando infusiones corticales de isoguvacina, un agonista GABA_A específico,^{4,5} y por la otra, la constatación de que los agonistas específicos del receptor GABA_B (baclofén) no sólo no inducen un incremento en la excitabilidad neuronal, sino que, por el contrario, inducen por sí mismos la aparición de actividad paroxística en el sitio de inyección cortical. Asimismo, los antagonistas GABA_B (baclofén) no tienen ningún efecto sobre el síndrome de abstinencia al GABA.

Los estudios farmacológicos sobre la abstinencia al GABA, utilizando agentes anticonvulsivantes, sedantes e hipnóticos, muestran resultados sorprendentes. Es necesario hacer énfasis en que la responsividad farmacológica de la hiperexcitabilidad neuronal inducida por la abstinencia al GABA a diferentes fármacos administrados por vía sistémica varía de acuerdo con el tiempo de evolución de la actividad paroxística. El síndrome de abstinencia a GABA, es, en sus primeras 24h, resistente a los anticonvulsivos usados clínicamente (fenitoína, barbitúricos, etosuccimida, ácido valproico, carbamazepina) e incluso al fármaco de elección en casos de status epiléptico: el diazepam. Dosis que van hasta 15 mg/kg., IP de esta benzodiacepina no afectan la frecuencia de descarga de la actividad paroxística, a pesar de que el animal se halle profundamente sedado. Incluso, el pentobarbital a dosis anestésicas (35mg/kg) no modifica significativamente la frecuencia del foco de descarga cortical. Por estas evidencias, la abstinencia a GABA es un modelo de hiperexcitabilidad neuronal intratable en sus primeros estadios, en el cual es posible ensayar fármacos anticonvulsivos y sedantes.^{5,13}

La abstinencia al GABA también depende de la formación de nuevas proteínas. La anisomicina y la ciclohexamida, agentes inhibidores de la síntesis de proteínas, bloquean la aparición de la actividad hiperexcitable. Aspecto farmacológico semejante a lo que sucede en la inducción del LTP del área CA3 del hipocampo.¹⁴

A partir del segundo día de la abstinencia al GABA, la responsividad farmacológica cambia, y se observan efectos anticonvulsivos cuando se administran fármacos antagonistas del receptor al NMDA como la ketamina, el amino-fosfano heptanoato (APH) y el MK-801, o benzodiacepinas como el clonazepam. Lo cual indica que otros neurotransmisores se suman a la hiperexcitabilidad neuronal. En este contexto, es necesario mencionar que la actividad paroxística focal característica de la abstinencia al GABA puede ser inhibida si la infusión local del GABA es reiniciada así sea en las fases iniciales de la hiperexcitabilidad.^{3,5}

En estudios relacionados se identificó que la taurina, otro aminoácido con efectos inhibidores de la actividad cortical, no es capaz de inducir fenómenos de abstinencia. Los

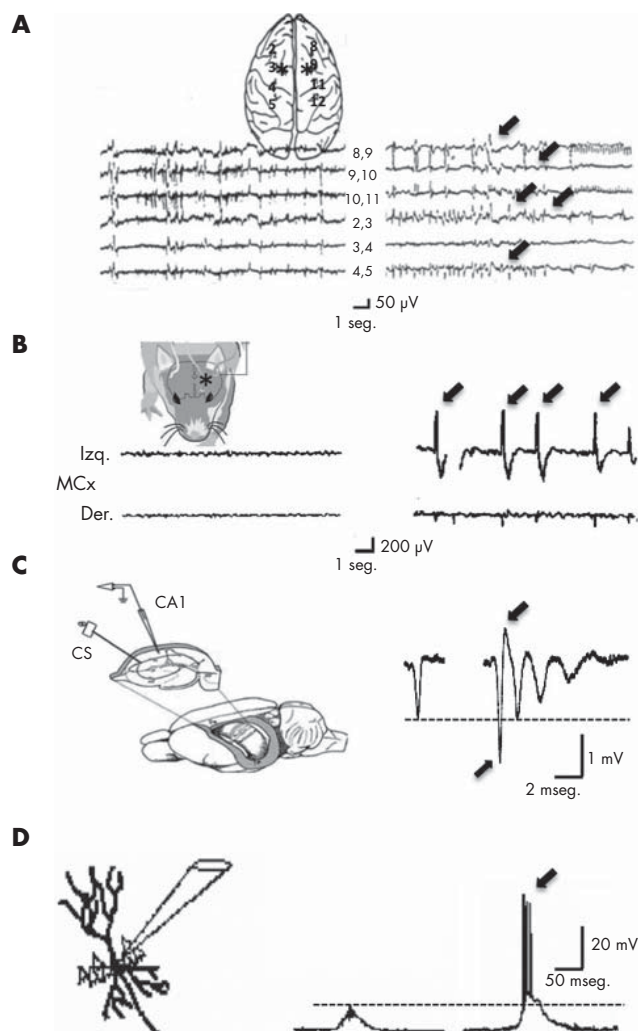


Figura 1. La hiperexcitabilidad neuronal de la abstinencia al GABA en cuatro abordajes de estudio electrofisiológicos distintos. **(A)** El EEG de un mandril fotosensible tomado antes (registros de la izquierda) y 24h después de la instilación de GABA (conjunto de registros de la derecha). La aparición de actividad anormal espontánea que se aprecia (flechas negras) se observa con mayor amplitud cerca de las zonas de infusión (asteriscos en ambas regiones parietales, canales 3 y 9). Este incremento de actividad posterior a la desconexión de GABA coexiste con la epilepsia fotosensible previa que tienen estos mamíferos. **(B)** El modelo de abstinencia a GABA al EEG es reproducible en ratas. Ambas cortezas motoras (MCx) se registran en condiciones control (registros del panel izquierdo) 90 min., después de interrumpir la instilación de GABA en la corteza izquierda (Izq.) aparecen complejos espiga-onda de alta frecuencia y amplitud los cuales son exclusivos de la zona que recibió GABA, en contraste con la corteza derecha (Der.) no manifiesta cambios en la actividad EEG basal. **(C)** La abstinencia a GABA en su correlato *in vitro*. En rebanadas de cerebro en las cuales se registró la actividad sináptica del área CA1 del hipocampo por estimulación de los axones de las neuronas provenientes del área CA3 (Colaterales de Shaffer: CS) se obtienen registros de potenciales sinápticos excitatorios de campo (EPSP, por sus siglas en inglés), en condiciones control, la respuesta sináptica mantiene su amplitud (línea discontinua), sin embargo, de 2h después de eliminar el GABA del medio de perfusión, se induce un incremento significativo de la amplitud de la espiga sináptica (flecha negra), esto traduce que durante la abstinencia un incremento en la sincronía de disparos de potenciales de acción de las poblaciones neuronales registradas en la rebanada. **(D)** Registro intracelular de una neurona en condiciones control (izquierda) y en abstinencia a GABA (derecha), las neuronas en condiciones de hiperexcitabilidad por la abstinencia manifiestan una disminución en el umbral de disparo y la aparición de disparos de potenciales de acción en forma de ráfagas (marcado por la flecha).

mismos resultados negativos se obtuvieron con infusiones crónicas con glicina, a concentraciones equivalentes y por tiempos comparables a los del GABA. Ambos aminoácidos, glicina y taurina, no tienen efectos inhibitorios sobre el síndrome de abstinencia al GABA.

Este modelo de hiperexcitabilidad neuronal cortical por abstinencia al GABA es un modelo *sui generis* para el estudio de las abstinencias clínicas, el cual puede impactar directamente en dos vertientes: 1. en el estudio de la etiología, evolución y consecuencias de las abstinencias por drogas que incrementan la actividad GABAérgica, y 2. en el desarrollo de estrategias para aminorar los efectos y consecuencias de las abstinencias farmacológicas inducidas por estos mismos fármacos.

ABSTINENCIA AL GABA IN VITRO

Estudio de fenómenos sinápticos y celulares

Se han obtenido dos vertientes en los registros de rebanadas de cerebro en la abstinencia al GABA. Los primeros registros se obtuvieron de cerebros de animales que habían desarrollado un síndrome de abstinencia al GABA; los resultados de estos experimentos mostraron los cambios en las manifestaciones de la excitabilidad de la membrana neuronal.^{13,15} La segunda variante es que se ha caracterizado a la hiperexcitabilidad neuronal en rebanadas de cerebro de la corteza cerebral o del hipocampo, sin que previamente el animal tenga alguna manipulación, es decir, es posible generar hiperexcitabilidad neuronal por abstinencia a GABA en tejido cerebral sano; por medio de estos experimentos logramos identificar los cambios en la actividad sináptica y del receptor GABA_A.¹⁶⁻¹⁸

Experimentos realizados en rebanadas de corteza cerebral obtenidas de ratas que presentaban *in vivo* una abstinencia al GABA clínica (mioclonías unilaterales, abundante salivación, movimientos rítmicos de las vibrisas, inmovilidad) y eléctrica (espigas en el sitio de infusión cuantificadas en el EEG) permitieron identificar algunos cambios biofísicos y sinápticos en el sitio de instilación del GABA. La estimulación eléctrica de la sustancia blanca situada en el mismo plano columnar del sitio de registro indujo en todas las células analizadas despolarizaciones paroxísticas acompañadas de trenes de potenciales de acción de alta frecuencia. Estas actividades son las llamadas despolarizaciones paroxísticas gigantes o PDS (*paroxysmal depolarization shift*, por sus siglas en inglés).¹⁹ En estas rebanadas se encontró una población de neuronas que presentaban, además de los PDS inducidos sinápticamente, trenes de potenciales de acción de alta frecuencia provocados por la inyección intracelular de corriente. Estas neuronas con capacidades intrínsecas para la generación de PDS se diferenciaron de las otras (*i.e.*, aquellas en

las que los PDS sólo podían ser producidos por estimulación sináptica) por: a) presentar potenciales voltaje-dependientes (EPSP, potenciales postsinápticos excitatorios, por sus siglas en inglés); b) presentar PDS calcio-dependientes: la sustitución del calcio del medio por cobalto produjo la desaparición de los trenes de potenciales de acción de alta frecuencia inducidos por corriente para dar paso a potenciales únicos, y c) una mayor tolerancia a los efectos hiperpolarizantes del GABA aplicado al baño en el que se mantenían las rebanadas. Esta tolerancia se manifestó como un aumento de 50 a 100 veces en la DE_{50} (concentración efectiva₅₀) de la isoguvacina (agonista específico de los receptores GABA_A) en estas células, en comparación con las neuronas con PDS sinápticos,¹³ 50-100 veces mayor para estas células que para las neuronas con PDS sinápticos usando la isoguvacina, agonista específico de los receptores GABA_A (figura 1C).

A partir de registros intracelulares de neuronas piramidales (localizadas en las capas III/IV de la corteza cerebral, sitio de instilación del GABA) realizados en rebanadas de cerebro provenientes de animales que presentaban *in vivo* un síndrome de abstinencia, identificamos algunos cambios en la excitabilidad de la membrana neuronal y en las propiedades de disparo celular; por ejemplo, se manifiesta una importante modificación del umbral de disparo asociado a una reducción de la adaptación de disparo de potenciales de acción (relación de adaptación, definido como el cociente del último intervalo inter-espiga entre el primer intervalo), además de una reducción significativa del pospotencial hiperpolarizante. Estos datos son semejante a los cuantificados en neuronas epilépticas,² en otros tipos de abstinencias,²⁰⁻²² en condiciones de cambios metabólicos de la corteza cerebral,²³ efectos mediados por benzodiazepinas^{24,25} y abstinencia al alcohol.²⁶

En rebanadas de hipocampo y corteza cerebral de rata, incubadas con GABA durante 120 min, se constató la aparición de hiperexcitabilidad neuronal caracterizada por un aumento extraordinario de la respuesta de campo de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo una hora después de retirar el aminoácido de la perfusión. Además, también se observa la abolición de la inhibición recurrente mediada por el GABA, evaluada mediante el paradigma de la estimulación por pulsos pareados.¹⁸ Posteriormente, en rebanadas de corteza cerebral se logró caracterizar la hiperexcitabilidad neuronal por abstinencia al GABA específicamente en la corteza somatomotora.¹⁶ En esta región del cerebro, la abstinencia del aminoácido genera descargas neuronales con incremento progresivo en su amplitud, que se asemejan a la actividad paroxística cuantificada en modelos de epilepsia y abstinencia a benzodiazepinas (flunitrazepam y clonazepam).

La generación de la hiperexcitabilidad por retiro de GABA es también inducible en células en cultivo. Estudios en células aisladas han identificado neuronas disociadas del hipocampo del área CA1, cultivadas durante dos semanas, con la característica electrofisiológica de células con corrientes sinápticas en intervalos regulares. Una exposición breve de

GABA a estas neuronas causa una supresión total de la actividad espontánea. Al retiro de GABA, la actividad se incrementa, las corrientes son más grandes e incrementan su frecuencia comparadas a las condiciones control. Este evento perduró de uno a dos días después del lavado del GABA (figura 1D).²⁷

Durante la actividad neuronal por la abstinencia del GABA *in vitro*, se han logrado confirmar dos aspectos importantes: 1. la disminución de la liberación de GABA radioactivo por el tejido,¹⁶ y 2. una disminución del número de receptores activos GABA_A.¹⁷

La potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) representa un modelo y un sustrato electrofisiológico de los procesos de memoria. La LTP es un incremento en la eficacia sináptica que se caracteriza por un incremento de la actividad sináptica después de una estimulación de alta frecuencia en la vía aferente del sitio en el que se registra. Es lógico plantear si la hiperexcitabilidad generada por la abstinencia de GABA *in vitro* puede favorecer la inducción o aparición de otro fenómeno de plasticidad cerebral. Al respecto, realizamos experimentos en los cuales la abstinencia de GABA favorece la inducción, la expresión y el mantenimiento de la LTP en la corteza cerebral y en el hipocampo, estructuras del Sistema Nervioso Central que están involucradas directamente en los procesos de aprendizaje y memoria de los mamíferos.^{28,29}

El estudio de la interacción de la hiperexcitabilidad por abstinencia al GABA puede abrir nuevas oportunidades para el desarrollo de una nueva serie de sustancias anticonvulsivas y del cernimiento de fármacos para protección neuronal, sedantes, con impacto en la farmacología del tratamiento de la dependencia de medicamentos que causan dependencia física como los que generan las drogas más frecuentemente utilizadas: las benzodiazepinas y el alcohol.^{11,30,31}

ABSTINENCIA DE DIVERSAS DROGAS Y SU RELACIÓN CON MODIFICACIONES DEL RECEPTOR GABA_A

Las modificaciones postsinápticas del sistema GABAérgico son un mecanismo común de las abstinencias que inducen el alcohol, las benzodiazepinas, los neuroesteroides y los barbitúricos.^{5,9,16,32-34} En el campo de la Psiquiatría y de las Neurociencias se tiene, el consenso de que los cambios en el receptor GABA_A son una consecuencia farmacológica de la abstinencia de su ligando. Se tiene documentado ampliamente que en condiciones de abstinencia se expresan nuevos receptores GABA_A, los cuales son menos funcionales o que farmacológicamente muestran una disminución en la sensibilidad a los agonistas que lo activan. Este evento tiene como origen molecular el incremento o la disminución de la expresión de algunos tipos de subunidades que conforman al receptor GABA_A.^{9,10,34} Así, por ejemplo, el diazepam disminuye la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 2$ y $\gamma 2$ e incrementa la expresión de la subunidad $\alpha 5$ reduciendo la sen-

sibilidad farmacológica del receptor;³⁵⁻³⁹ aspecto semejante inducen los neuroesteroides: progesterona y su metabolito reducido, la alopregnanolona, las cuales favorecen la expresión de las subunidades $\alpha 4$, $\beta 1$ y δ durante su abstinencia al mismo tiempo que reducen la expresión de la subunidad $\alpha 1$.^{33,34,40,41} La administración crónica de pentobarbital incrementa la expresión de la subunidad $\beta 2$.⁴² La abstinencia inducida por el alcohol genera una disminución de la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\gamma 2L$ y $\gamma 2s$, o un incremento de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$.^{34,38,43,44} Sin embargo, otros reportes mencionan incrementos significativos de las subunidades $\alpha 4$ y $\gamma 2$ durante la abstinencia alcohólica.^{36,42} Estos cambios en la modificación de la expresión de subunidades son identificados horas después de haberse interrumpido la administración o la infusión de las drogas (entre cuatro a 24h).

Con estas evidencias resulta lógico preguntarse ¿Cuáles son los cambios que se suscitan en el receptor GABA_A durante la hiperexcitabilidad inducida por el GABA? La expresión de subunidades que componen al receptor durante la abstinencia a GABA en neuronas piramidales de corteza cerebral indican una disminución de la expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor GABA_A (como lo hacen la progesterona, la alopregnanolona y el alcohol) y la subunidad $\alpha 2$, contrario a lo que induce la abstinencia de alcohol.⁴⁵

OTROS NEUROTRANSMISORES INVOLUCRADOS EN LA ABSTINENCIA A GABA

Los incrementos de la excitabilidad neuronal cuantificados *in vivo* e *in vitro* en las abstinencias GABAérgicas asocian cambios en otros neurotransmisores; por ejemplo, las abstinencias de pentobarbital y diazepam se acompañan del incremento significativo de la expresión de receptores NMDA.⁴⁶ El incremento en la actividad del receptor NMDA del área CA1 de rebanadas de hipocampo por etanol es una de las características tardías de la abstinencia por el alcohol.³² Durante la hiperexcitabilidad por GABA, las neuronas de la corteza somatomotora que presentan incremento en su actividad muestran una disminución de la actividad de los receptores muscarínicos,⁴⁷ un incremento en la activación de receptores nicotínicos,⁴⁸ una disminución de la corriente saliente de K⁺,^{42,47} así como un incremento de la expresión de la enzima acetilcolinesterasa en el foco de la descarga epiléptica.⁴⁹ Abstinencias inducidas por la interrupción de la administración de drogas como las benzodiazepinas generan un incremento de la expresión de receptores a opiáceos. Asimismo, el pretratamiento con benzodiazepinas disminuye los síntomas de abstinencia a morfina.^{24,25,50} Estos aspectos y cambios sinápticos en conjunto sugieren un arreglo funcional y neuroquímico de la corteza cerebral y del hipocampo como consecuencia de la hiperexcitabilidad durante las abstinencias. Las implicaciones del cambio GABAérgico que

impactan en otras neurotransmisiones son un terreno poco explorado. Es posible que en el SAG, en estadios tardíos, existan incrementos de la actividad glutamatérgica, colinérgica y opiodérgica.

La búsqueda de la reducción de los síndromes de abstinencia

Reducir los signos y síntomas de las abstinencias a su máxima expresión es un evento esperado en la terapéutica hospitalaria.⁵¹ Desde el punto de vista experimental, este proceso puede tener un nuevo enfoque: nuestros resultados proponen lograr el bloqueo o la reducción de la hiperexcitabilidad neuronal por abstinencia a GABA a expensas de una administración secuencial de al menos dos drogas pro-GABAérgicas. Este aspecto es reciente en el ámbito de las neurociencias. Así, por ejemplo, algunas abstinencias por drogas agonistas del receptor GABA_A, como en la abstinencia inducida por el alcohol en la que se genera un proceso de *up-regulation* de la subunidad $\alpha 2$ del receptor, la administración conjunta de alcohol y ácido γ -hidroxi-butírico (GHB) revierte el incremento de expresión de esta subunidad.^{37,38} Asimismo, la exposición de 48 horas del neuroesteroide alopregnanolona a neuronas del hipocampo en cultivo favorece un incremento de la expresión de la subunidad $\alpha 4$; este proceso se ve bloqueado por una administración corta de alcohol a bajas concentraciones, las cuales, por sí solas no inducen abstinencia.³⁴ Por otra parte, se tiene identificado que la administración de diazepam en etapas iniciales de la ingesta de alcohol reduce los cambios en las subunidades del receptor GABA_A que induce la abstinencia inducida por el alcohol, aspecto que no puede resarcir el baclofén.⁵² De la misma manera, el pretratamiento con diazepam bloquea el efecto de incremento en la expresión de la subunidad $\alpha 4$ inducida por la abstinencia al alcohol.⁵² La administración previa y coadministración de progesterona, alopregnanolona y el sulfato de pregnenolona con diazepam o triazolam reducen la tolerancia, ansiedad e hiperactividad cuantificada por las benzodiazepinas.⁹⁻¹¹

La lectura global de estas evidencias permite elaborar una hipótesis relacionada con la posibilidad de disminuir la abstinencia que induce una droga GABAérgica mediante la aplicación de otra que ocupa el mismo receptor. Ante este planteamiento, nuestra línea de trabajo resulta esencial para probar esta presunción científica. De esta manera, resultados electrofisiológicos en rebanadas de hipocampo han permitido identificar que la abstinencia a GABA puede reducirse en un 47% por alcohol si este agonista del receptor GABA_A se expone previamente al GABA. Si es diazepam el que se expone antes del GABA, la abstinencia a GABA se reduce en un 67%. En este contexto, la alopregnanolona es capaz de bloquear totalmente los datos de hiperexcitabilidad neuronal por abstinencia a GABA *in vitro*. Es decir, la abstinencia a GABA es susceptible de reducirse si un agonista del receptor GABA_A modifica la estructura proteica del mismo antes de que el

GABA reconozca a su receptor. Estos resultados plantean una nueva alternativa en el manejo farmacológico de abstinencias que involucran a esta neurotransmisión.^{10,24,27,53-55}

En resumen, la abstinencia a GABA tiene actualmente algunos puntos resueltos en el campo de las neurociencias: modificaciones presinápticas y postsinápticas con cambios en la concentración del GABA en el espacio sináptico, que traducen el incremento de la excitabilidad neuronal.

1. Desde el punto de vista clínico, el síndrome de abstinencia al GABA recuerda varios cuadros observados en el humano: un cuadro de *status* epiléptico focal asociado a hiperexcitabilidad neuronal.
2. Desde el punto de vista fisiopatológico, la abstinencia al GABA se encuentra relacionada con aquellos síndromes caracterizados por alteraciones de la transmisión inhibitoria y se asemeja a otros modelos de epileptogénesis inducida por bloqueadores del GABA, como la bicuculina o la picrotoxina. Ambos modelos se acompañan de hiperexcitabilidad neuronal, de hipermetabolismo glucídico y de cambios neuropatológicos compatibles con excitotoxicidad.
3. Farmacológicamente, la hiperexcitabilidad por abstinencia al GABA constituye un fenómeno dependiente de receptores GABA_A, que se acompaña de disminución en la actividad y en la expresión de la enzima GAD; estos eventos se asocian a la tolerancia de agonistas específicos de este receptor (la isoguvacina). En su génesis, coexisten una disminución en la liberación de GABA y una disminución de receptores GABA_A. Por otra parte, la reactividad farmacológica del SAG varía

con el tiempo de evolución: extremadamente resistente en las primeras 24 horas y sensible a benzodiacepinas después del segundo día.

4. En la abstinencia al GABA se manifiestan, además de los cambios sinápticos, modificaciones en las propiedades de disparo neuronal, las neuronas se hacen más excitables en los estadios iniciales del SAG. Se reduce el umbral de disparo neuronal. El postpotencial hiperpolarizante se reduce en amplitud aunado a un incremento significativo de calcio intracelular.
5. El síndrome de abstinencia a GABA tiene un correlato *in vitro*: puede inducirse hiperexcitabilidad neuronal por abstinencia de GABA en rebanadas de cerebro y en neuronas disociadas.
6. El SAG puede relacionarse a síndromes de carencia o abstinencias semejantes a los que se observan después de suspender bruscamente la administración prolongada de sustancias como los barbitúricos, las benzodiacepinas, los neuroesteroides o el alcohol, sustancias que se caracterizan por facilitar la transmisión GABAérgica.
7. Los mecanismos de inicio de la abstinencia son dependientes del receptor GABA_A. En tanto que los mecanismos de mantenimiento involucran otras neurotransmisiones que facilitan el proceso de hiperexcitabilidad.
8. El incremento de la excitabilidad neuronal por efecto de la privación de GABA ofrece oportunidades para investigar los cambios plásticos neurogliales que ocurren a consecuencia de modificaciones en los niveles del neurotransmisor inhibitorio predominante del Sistema Nervioso Central (*i.e.*, facilita la LTP). Favorece conside-

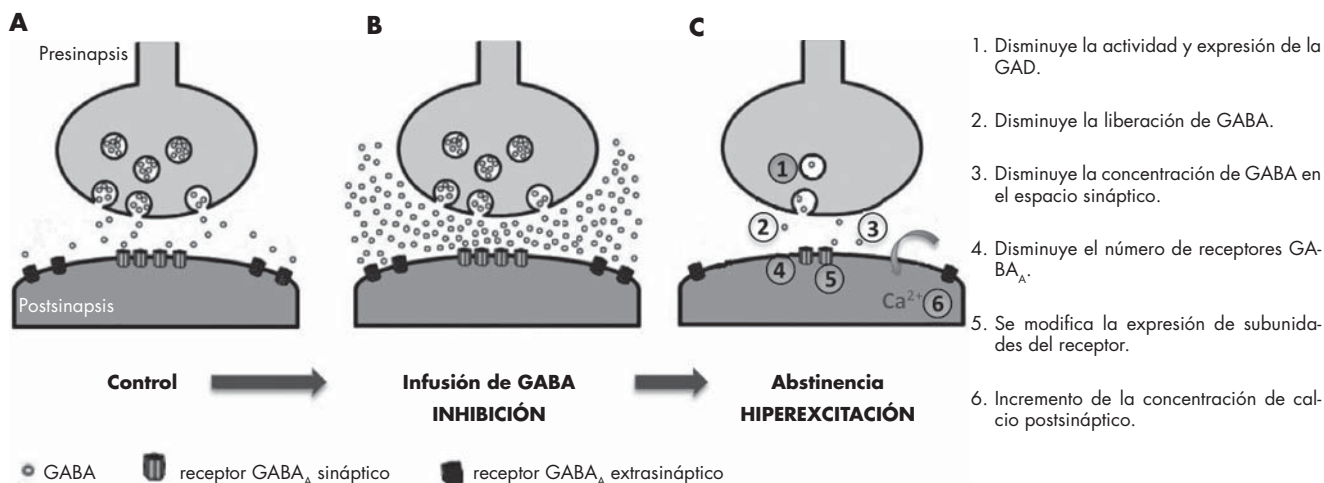


Figura 2. Mecanismos sinápticos que explican el incremento de la actividad neuronal de la abstinencia a GABA. **(A)** Esquema básico de una sinapsis GABAérgica, con los elementos pre- y postsinápticos: en la presinapsis se elabora, almacena y se libera el GABA. En la postsinapsis, el receptor GABA_A sináptico y extrasináptico modulan la inhibición. **(B)** La instilación de GABA (5mM/120min) incrementa significativamente al aminoácido en el espacio sináptico, lo cual interfiere directamente sobre ambos componentes sinápticos. **(C)** En el componente presináptico, la síntesis de GABA se reduce por una disminución de la actividad y la expresión de la enzima GAD(1), el neurotransmisor empaquetado, disminuye su liberación(2), en consecuencia, la concentración de GABA en el espacio sináptico disminuye(3). En el componente postsináptico, los cambios inmediatos son una reducción en la densidad de receptores(4) y en forma gradual, nuevos receptores GABA_A tienen una disminución en su sensibilidad farmacológica debido a cambios en su composición por expresión de nuevas subunidades(5). Finalmente, el proceso de incremento en la excitabilidad se ve favorecido por un aumento en la conductancia de calcio, el cual, predispone a un más las propiedades excitables de las neuronas(6).

blemente el análisis neuroquímico y neurofarmacológico sin la limitación de contar con muestras pequeñas de tejido excitable.

9. Finalmente, los eventos que inician el incremento de la excitabilidad neuronal por abstinencia al GABA pueden reducirse si un agonista del receptor se expone previamente al GABA. Un neuroesteroide, la alopregnanolona, tiene la mayor potencia para generar este efecto.

REFERENCIAS

1. Brailowsky S. Myoclonus in Papio papio. *Mov Disord* 1991;6:98-104.
2. Brailowsky S, Silva-Barrat C, Menini C, Riche D et al. Effects of localized, chronic GABA infusions into different cortical areas of the photosensitive baboon, *Papio papio*. *Electroencephalographic Clin Neurophysiol* 1989;72:147-156.
3. Brailowsky S, Kunitomo M, Menini C, Silva-Barrat C et al. The GABA withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain Res* 1988;442:175-179.
4. Brailowsky S, Kunitomo M, Silva-Barrat C, Menini C et al. Electroencephalographic study of the GABA-Withdrawal syndrome in rats. *Epilepsia* 1990;31:369-377.
5. Brailowsky S. The GABA-withdrawal syndrome. *Proc West Pharmacol Soc* 1991;34:227-228.
6. Fukuda H, Brailowsky S, Menini C, Silva-Barrat C et al. Anticonvulsant effect of intracortical, chronic infusion of GABA in kindled rats: focal seizures upon withdrawal. *Exp Neurol* 1987;98:120-129.
7. Menini C, Mraovitch S, Calando Y, De La Sayette V et al. Metabolic anatomy of the focal epilepsy produced by cessation of chronic intracortical GABA infusion in the rat. *Neuroscience* 1991;41:607-615.
8. Morrow AI, Vandoren MJ, Penland SN, Matthews DB. The role of GABAergic neuroactive steroids in ethanol action, tolerance and dependence. *Brain Res Rev* 2001;37:98-109.
9. O'Brien CP. Benzodiazepine use, abuse and dependence. *J Clin Psychiatry* 2005;66:28-33.
10. Olmedo R, Hoffman RS. Withdrawal syndromes. *Emerg Med Clin North Am* 2000;18:273-288.
11. Salazar P, Montiel T, Brailowsky S, Tapia R. Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of gamma-amino butyric acid. *Neurochem Int* 1994;24:363-368.
12. Kumar S, Porcu P, Warner D, Matthews D et al. The role GABA_A receptor in the acute and chronic effect of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacol* 2009;205:1-54.
13. Silva-Barrat C, Champagnat J, Brailowsky S, Menini C et al. Relationship between tolerance to GABA_A agonist and bursting properties in neocortical neurons during GABA-withdrawal syndrome. *Brain Res* 1989;498:289-298.
14. Calixto E, Thiels E, Klann E, Barrionuevo G. Early maintenance of hippocampal Mossy Fiber-Long-Term Potentiation depends on protein and RNA synthesis and presynaptic granule cell integrity. *J Neuroscience* 2003;23:4842-4849.
15. Silva-Barrat C, Champagnat J. A potassium current controls burst termination in rat neocortical neurons after GABA withdrawal. *Neurosci Lett* 1995;189:105-108.
16. Calixto E, López-Colomé AM, Casasola C, Montiel T et al. Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal in vitro. *Epilepsy Res* 2000;39:13-26.
17. Casasola C, Bargas J, Arias-Montaña JA, Calixto E et al. Hippocampal hyperexcitability induced by GABA withdrawal is due to down-regulation of GABA(A) receptors. *Epilepsy Res* 2001;47:257-271.
18. García-Ugalde G, Galarraja E, Bargas J, Brailowsky S. Hyperexcitability of hippocampal CA1 region in brain slices after GABA withdrawal. *Neurosci Lett* 1992;147:229-232.
19. Wirsén A, Stenberg G, Rosen I, Ingvar DH. Quantified EEG and cortical evoked responses in patients with chronic traumatic frontal lesions. *Electroencephalographic Clin Neurophysiol* 1992;84:127-138.
20. Krystal J, Staley J, Mason G, Petrakis I et al. Gamma-amino butyric acid type A receptors and alcoholism. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63:957-968.
21. Liang J, Suryanarayanan A, Abriam A, Olsen R et al. Mechanism of reversible GABA_A receptor plasticity after ethanol intoxication. *J Neuroscience* 2007;27:12367-12377.
22. Licata S, Rowlett J. Abuse and dependence liability of benzodiazepine type drugs: GABA_A receptor modulation and beyond. *Pharmacol Biochem Behavior* 2008;90:74-89.
23. Kelly T, Church J. pH modulation of currents that contribute to the medium and slow after hyper polarizations in rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 2004;554:449-466.
24. Valverde O, Maldonado R, Mico JA, Gibert-Rahola J. Study of the mechanisms involved in behavioral changes induced by flunitrazepam in morphine withdrawal. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1995;19:973-991.
25. Valverde O, Mico JA, Maldonado R, Gibert-Rahola J. Changes in benzodiazepine-receptor activity modify morphine withdrawal syndrome in mice. *Drug Alcohol Depend* 1992;31:293-300.
26. Yang L, Long C, Evans MS, Faingold C. Ethanol withdrawal results in aberrant membrane properties and synaptic responses in periaqueductal gray neurons associated with seizure susceptibility. *Brain Res* 2002;957:99-108.
27. Golan H, Mikenberg K, Greenberger V, Segal M. GABA withdrawal modifies network activity in cultured hippocampal neurons. *Neural Plast* 2000;7:31-42.
28. Casasola C, Montiel T, Calixto E, Brailowsky S. Hyperexcitability induced by GABA withdrawal facilitates hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience* 2004;126:163-171.
29. Montiel T, Almeida D, Arango I, Calixto E et al. Long-lasting effects of GABA infusion into the cerebral cortex of the rat. *Neural Plast* 2000;7:1-8.
30. Calixto E, Montiel T, Lemini C, Brailowsky S. Allopregnanolone potentiates a GABA-withdrawal syndrome in the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 1995;195:73-76.
31. Strzelec JS, Czarnecka E. Influence of clonazepam and carbamazepine on alcohol withdrawal syndrome, preference and development of tolerance to ethanol in rats. *Pol J Pharmacol* 2001;53:117-124.
32. Nelson TE, Ur CL, Gruol DL. Chronic intermittent ethanol exposure enhances NMDA-receptor-mediated synaptic responses and NMDA receptor expression in hippocampal CA1 region. *Brain Res* 2005;1048:69-79.
33. Smith SS, Shen H, Gong H, Zhou X. Neurosteroids regulation of GABA_A receptor. Focus on the $\alpha 4$ and δ subunit. *Pharmacol Ther* 2007;116:58-76.
34. Smith SS, Gong QH. Neurosteroid administration and withdrawal alter GABA_A receptor kinetics in CA1 hippocampus of female rats. *J Physiol* 2005;564:421-436.
35. Cagetti E, Liang J, Spigelman I, Olsen RW. Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABA_A receptors. *Mol Pharmacol* 2003;63:53-64.
36. Cagetti E, Franco M, Trapani G, Biggio G. Changes in GABA (A) receptor gene expression induced by withdrawal of, but not by long-term exposure to zaleplon or zolpidem. *Neuropharmacology* 2002;42:191-198.
37. Follés P, Mancuso L, Biggio F. Diazepam during prior ethanol withdrawals does not alter seizure susceptibility during a subsequent withdrawal. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;68:339-346.
38. Follés P, Biggio F, Mancuso L, Cabras S et al. Ethanol withdrawal-induced up-regulation of the $\alpha 2$ subunit of the GABA_A receptor and its prevention by diazepam or gamma-hydroxy butyric acid. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;120:130-137.

39. Izzo E, Auta J, Impagnatiello F, Pesold C et al. Glutamic acid decarboxylase and glutamate receptor changes during tolerance and dependence to benzodiazepines. *PNAS* 2001;98:3483-3488.
40. Gulinello M, Gong Qh, Li X, Smith SS. Short-term exposure to a neuroactive steroid increases $\alpha 4$ GABA(A) receptor subunit levels in association with increased anxiety in the female rat. *Brain Res* 2000;910:55-66.
41. Griffiths J, Lovick T. Withdrawal from progesterone increases expression of $\alpha 4$, $\beta 1$, and δ GABA(A) receptor subunits in neurons in the periaqueductal gray matter in female Wistar rats. *J Comp Neurol* 2005;486:89-97.
42. Oh S, Ho IK. Changes of [3H] muscimol binding and GABA (A) receptor $\beta 2$ -subunit mRNA level by tolerance to and withdrawal from pentobarbital in rats. *Neurochem Res* 1999;24:1603-1609.
43. Crews Ft, Bucklry T, Dodd PR, Ende G et al. Alcoholic neurobiology: changes in dependence and recovery. *Alc Clin Exp Res* 2005;29:1504-1513.
44. Mhatre MC, Ticku MK. Chronic GABA treatment down-regulates the GABA_A receptor $\alpha 2$ and $\alpha 3$ subunit mRNAs as well as polypeptide expression in primary cultured cerebral cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;(1-4):159-165.
45. Hui S, Sabaliauskas N, Sherpa A, Fenton A et al. A critical role for $\alpha 4\beta \delta$ GABA_A receptors in shaping learning deficits at puberty in mice. *Science* 2010;327(5972):1515-1518.
46. Jang CG, Oh S, Ho IK. Changes in NMDAR2 subunit mRNA levels during pentobarbital tolerance/withdrawal in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neurochem Res* 1998;23:1371-1377.
47. Silva-Barrat C, Velluti J, Szenté M, Batini C et al. Exaggeration of epileptic-like patterns by nicotine receptor activation during the GABA withdrawal syndrome. *Brain Res* 2005;1042:133-143.
48. Silva-Barrat C, Szenté M, Menini C, Velluti JC et al. Muscarinic depression of synaptic transmission in the epileptogenic GABA withdrawal syndrome focus. *J Neurophysiol* 2001;85:2159-2165.
49. Araneda S, Silva-Barrat C, Menini C, Naquet R. High expression of noradrenaline, choline acetyltransferase and glial fibrillary acid protein in the epileptic focus consecutive to GABA withdrawal. An immunocytochemical study. *Brain Res* 1994;655:135-146.
50. Suzuki T, Tsuda M, Narita M, Funada M et al. Diazepam pretreatment suppresses morphine withdrawal signs in the mouse. *Life Sci* 1996;58:349-357.
51. Heberlein A, Bleich S, Kornhuber J, Hillemecher T. Benzodiazepine dependence: causalities and treatment options. *Fortschr Neurol Psychiatry* 2009;77:7-15.
52. Sanna E, Mostallino Mc, Busonero F, Talani G et al. Changes in GABA(A) receptor gene expression associated with selective alterations in receptor function and pharmacology after ethanol withdrawal. *J Neurosci* 2003;23:11711-11724.
53. Martin ED, Araque A, Buno W. Synaptic regulation of the slow Ca^{2+} -activated K^{+} current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *J Neurophysiol* 2001;86:2878-2886.
54. Reddy DS, Kulkarni SK. Neurosteroid co-administration prevents development of tolerance and augments recovery from benzodiazepine withdrawal anxiety and hyperactivity in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1997;19:395-405.
55. Behr J, Gloveli T, Heinemann U. Kindling induces a transient suppression of after hyperpolarization in rat subicular neurons. *Brain Res* 2000;867:259-264.

Artículo sin conflicto de intereses