

03062

2ej. 6

LIBRO DE TESIS  
1987

**RELACION ANATOMO-FUNCIONAL DE LA DINORFINA EN LA SUSTANCIA NIGRA  
RETICULADA DE RATA.**

Tesis que para obtener  
el grado de Maestro en  
Investigación Biomédica  
Básica presenta la

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Biol. María Antonieta  
Lavin Plasencia.

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

### RESUMEN

#### I.- INTRODUCCION GENERAL:

##### A).- Anatomía de los Ganglios Basales.

- 1).- Estriado.  
Aferentes  
Eferentes.
- 2).- Globo Pálido  
Aferentes  
Eferentes:  
Del Globo Pálido externo ( o Globo Pálido mismo)  
Del Globo Pálido interno (o Núcleo Entopeduncular).
- 3).- Sustancia Negra  
Aferentes:  
A la Sustancia Negra Compacta  
A la Sustancia Negra Reticulada  
Eferentes:  
De la Sustancia Negra Compacta  
De la Sustancia Negra Reticulada
- 4).- Núcleo Subtalámico  
Aferentes  
Eferentes
- 5).- Comentario General.

##### B).- Características Farmacológicas de la Dinorfina.

#### II.- SECCION EXPERIMENTAL

##### A).- Introducción

##### B).- Material, Método y Procedimiento.

- a).- Animales y procedimiento de anestesia.
- b).- Cirugía, materiales y equipo para realizar el registro electrofisiológico.
- c).- Cirugía, materiales y equipo para realizar la estimulación de las eferentes nigrales.
- d).- Sustancias.
- e).- Procedimiento para el registro extracelular en la sustancia negra.

- 1.- Inyección del fármaco.
- 2.- Registro de células de SNR identificadas antidrómicamente.  
Prueba de colisión o cheque de potenciales.
- f).- Verificación histológica.
- g).- Verificación de la presencia de dinorfina.
- h).- Autorradiografía.
- i).- Estadística.

### C.- Resultados.

- a).- Efecto de la dinorfina en la sustancia negra reticulada
- b).- Efecto de la dinorfina marcada radioactivamente en sustancia negra reticulada.
- c).- Efecto de la dinorfina en la sustancia negra compacta.
- d).- Efecto de la dinorfina marcada en la sustancia negra compacta.
- e).- Efecto de la naloxona sobre la respuesta producida por la administración de dinorfina en sustancia negra reticulada.
- f).- Efecto de la administración del vehículo en la sustancia negra reticulada.
- g).- Efecto de la dinorfina en la SNR administrada a células de proyección talámica.
- h).- Efecto de la dinorfina en SNR en células de proyección tectal.
- i).- Efecto de la dinorfina en SNR en células de proyección a FRP.
- j).- Autorradiografía.

### III.-Discusión.

- 1.- Posibles efectos farmacológicos de la dinorfina y la naloxona.
- 2.- El efecto de la dinorfina es prolongado.
- 3.- Receptores a la dinorfina.
- 4.- Dinorfina, un modulador o un neurotransmisor?.
- 5.- Cooperación con GABA.
- 6.- Interacción con dopamina.
- 7.- Interacción con sustancia P.

### IV.- Conclusiones.

### V.- Referencias.

## Indice de Abreviaturas.

CS	--	Coliculo superior.
FRP	--	Formación Reticular Pontina.
GABA	--	Acido gamma aminobutirico.
GAD	--	Descarboxilasa del ácido glutámico.
HRP	--	Peroxidasa de raiz fuerte.
HPLC	--	Cromatografía líquida de alta precisión.
6-OHDA	--	6-Hidroxidopamina.
SNC	--	Sustancia Nigra Compacta.
SNR	--	Sustancia Nigra Reticulada.
TTX	--	Tetrodotoxina.
VMT	--	Núcleo Ventro-medial del tálamo.
WGA-HRP	--	Aglutinina de trigo conjugada con peroxidasa de raiz fuerte.

**Indice de Figuras.**

**Figura 1.- Esquema de la anatomía del sistema de ganglios basales.**

**Figura 2.- Esquema de las eferentes nigrales.**

**Figura 3.- Secuencia de los aminoácidos que forman las dinorfinas.**

**Figura 4.- Diagrama general del sistema de registro.**

**Figura 5.- Fotografía del sistema de electrodos dobles.**

**Figura 6.- Diagrama del diseño experimental.**

**Figura 7.- Prueba de choque.**

**Figura 8.- Diagramas que muestran los sitios de registro.**

**Figura 9.- Histogramas de la frecuencia de descarga de las células de la SNR. Efecto de la administración local de dinorfina.**

**Figura 10.- Histogramas de la frecuencia de descarga de las células de la SNC. Efecto de la administración local de dinorfina.**

**Figura 11.- Efecto de la aplicación de naloxona intraperitoneal e intravenosa sobre células de la SNR que responden a la aplicación de dinorfina.**

**Figura 12.- Histogramas de la frecuencia de descarga de las células de la SNR identificadas como eferentes a VMT. Efecto de la administración local de dinorfina.**

**Figura 13.- Histogramas de la frecuencia de descarga de las células de SNR identificadas como eferentes a CS. Efecto de la administración local de dinorfina**

**Figura 14.- Histogramas de frecuencia de descarga de las células de la SNR identificadas como eferentes a FRP. Efecto de la administración local de dinorfina**

**Figura. 15.- Cálculo de la velocidad de conducción.**

**Figura 16.- Histogramas de la frecuencia de descarga de células de la SNR con más de una aplicación de dinorfina.**

**Tabla 1.- Histograma de barras que muestra la respuesta de los diferentes grupos celulares a la aplicación de dinorfina, en las poblaciones eferentes de la SNR.**

## RESUMEN.

La dinorfina es un potente péptido endógeno ampliamente distribuido dentro del sistema nervioso central. El efecto de este péptido ha sido poco estudiado, concentrándose su estudio principalmente al efecto que tiene en el hipocampo. La sustancia nigra reticulada es uno de los sitios con más alta concentración del péptido y en esta área sólo se han llevado a cabo unos pocos trabajos farmacológico-conductuales. Lo anterior se discutirá en la Introducción, las secciones de Anatomía y en las Características Farmacológicas de la Dinorfina.

En el presente trabajo se analizan los cambios en la frecuencia de disparo de las células de la sustancia nigra reticulada subsiguientes a la aplicación local del péptido.

Se realizaron experimentos agudos empleando ratas macho albinas de la cepa Wistar, anestesiadas con halotano y fijadas en un aparato estereotáxico. Se efectuaron registros unitarios extracelulares en la SNR. La frecuencia de disparo se registró con la ayuda de un procesador de espigas conectado a un registrador. El péptido se aplicó por medio de presión de aire en la vecindad de la célula registrada mediante un sistema de electrodos de doble barril que consiste en que a la pipeta de registro se une una pipeta inyectora, la cual se conecta a un aparato de inyección por presión de aire.

La identificación antidrómica de las células se realizó estimulando en el área terminal y registrando en el soma. Se utilizaron la latencia fija y el choque de potenciales como criterios para identificar actividad antidrómica.

Los resultados indican que la administración local de dinorfina en la SNR produce una disminución en la frecuencia de disparo. Dentro de la población neuronal existen algunas células que muestran una disminución menos acentuada en la frecuencia de disparo y otras no modifican su frecuencia de disparo aun cuando el péptido se haya inyectado repetidas veces.

Cuando se realizó la identificación de las poblaciones celulares dentro del núcleo utilizando la estimulación antidrómica, se observó la existencia de tres poblaciones de células para cada grupo de eferentes. Una población mostró una marcada disminución en la frecuencia de disparo cuando se aplicó la dinorfina (39.6%), otra población mostró una disminución menos acentuada (38.5%) y la última (21.6%) no la modificó aparentemente.

Se discuten los posibles mecanismos involucrados en estos tres tipos de respuestas, que podrían implicar la presencia o no de receptores específicos para la dinorfina o la existencia de dos estados diferentes del receptor específico para el péptido.

## I.- INTRODUCCION GENERAL

Los ganglios basales son estructuras subcorticales derivadas del telencéfalo, que según sea el enfoque (anatómico, conductual, embriológico o fisiológico) con el cual se estudien, comprenden diversos núcleos. Actualmente y de tratándose de unificar criterios, se considera a este sistema formado por el caudoputamen (o estriado en algunas especies), el globo pálido, el núcleo entopeduncular, la sustancia negra y el núcleo subtalámico (Brodal, 1982).

Las funciones de los ganglios basales se han inferido principalmente de síndromos clínicos, con bases en las cuales han establecido su importancia en el control del movimiento voluntario e involuntario. Por ejemplo, las lesiones en el estriado y en el globo pálido producen corea de Huntington (McGeer et al, 1976b), las lesiones en el núcleo subtalámico producen hemibalismo (Carpenter et al, 1981) y la lesión de la vía estriado-nigral produce la enfermedad de Parkinson (Hornykiewicz, 1966). La siguiente sección sobre anatomía pretende dar un panorama general de las relaciones existentes entre los diversos componentes del sistema de los ganglios basales, para poder tener una visión general en dónde integrar la información que proporcionan los experimentos realizados en este trabajo. Como el propósito del presente trabajo fue estudiar la acción electrofisiológica del péptido dinorfina administrado localmente en la sustancia nigra reticulada, en la sección final de esta introducción se describen estudios sobre la distribución y el efecto de la dinorfina en el sistema nervioso.

## A).- ANATOMÍA DE LOS GANGLIOS BASALES.

En esta sección se revisará brevemente la anatomía de los principales componentes de los ganglios basales, ya que el núcleo que estudiaremos, la sustancia negra reticulada forma parte de este sistema. Además se revisarán las conexiones y componentes del circuito que forman los ganglios basales. Esta sección será de utilidad para la localización y la integración de la información presentada en los resultados y en la discusión (Figura 1).

### 1).- Estriado.

En los mamíferos pequeños como los roedores, el caudado y el putamen forman una sola masa grande, el caudo-putamen o estriado. A este núcleo lo atraviesan fibras que descienden de la corteza y que forman la cápsula interna. El caudado se continúa a lo largo del ventrículo lateral, y el putamen se sitúa a un lado de la cápsula interna. En los carnívoros y primates el estriado es relativamente más grande que el putamen y la cápsula interna separa ambos núcleos parcialmente. El cuerpo estriado contiene células de tamaño medio (12-18  $\mu\text{m}$ ) en una relación 50:1 y células de tamaño grande (20-30  $\mu\text{m}$ ) en una proporción 20:1. Estudios utilizando la técnica de Golgi indican que existen por lo menos dos tipos distintos de células, las llamadas "con espinas" y las "sin espinas", denominadas así por presentar o no en las dendritas, estructuras de este tipo (Passik et al, 1979). Las células pequeñas y sin espinas tienen axones cortos, las células con espinas tienen axones largos y pueden tener el cuerpo pequeño o grande (Passik et al, 1979).

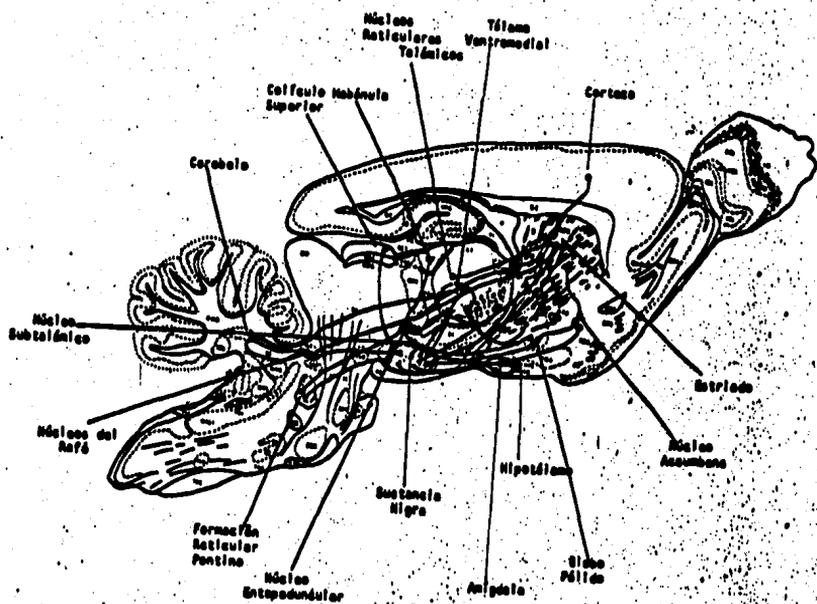


Figura 1.- Esquema que representa los principales componentes del sistema de Ganglios Basales.

En una serie de trabajos de Graybiel y Ragsdale (1978,a,b) se ha estudiado metódicamente la compartimentalización del estriado. Esta compartimentalización ha sido sugerida por estos autores utilizando autorradiografía, inyecciones de peroxidasa de raíz fuerte (HRP), e histoquímica, especialmente esta última para la acetilcolina. En 1929 Papco había ya descrito "agrupaciones tubulares" en el estriado, semejantes a islas. A estas "agrupaciones tubulares" se les ha denominado "estriosomas" en el gato y "porchos" en las ratas (Graybiel y Ragsdale, 1978 a,b). Este arreglo anatómico ha despertado el interés por descubrir su posible correlato funcional. Usando técnicas inmunohistoquímicas se ha establecido que en el estriado de gatos, se alternan estriosomas ricos en encefalinas, con estriosomas pobres en acetilcolina (Graybiel y Ragsdale, 1981). También se ha reportado la existencia de estriosomas de Sustancia P (Graybiel y Ragsdale, 1981). Por evidencias autorradiográficas se muestra que las fibras aferentes estriatales originadas en la corteza y en el tálamo terminan en agrupaciones tubulares de 0.5-1.0 mm de diámetro (Kunzio, 1975; Graybiel y Ragsdale, 1978 a,b).

#### Aferentes.

Las aferentes al estriado se originan al menos de cinco fuentes: corteza, núcleos intralaminares talámicos, sustancia negra compacta (SNc), núcleos del rafe y locus ceruleus (Mehter, 1981).

#### Corteza.

Las aferentes más numerosas al estriado son las que

proviene de las capas III y V de la corteza (Jones y Wisc, 1977). Existe un acuerdo general de que esta vía es importante para una postulada subdivisión regional del estriado y consecuentemente es relevante para los mecanismos de salida de este núcleo (Divac et al, 1977; Divac 1983). Para estudiar esta proyección se ha utilizado una gran variedad de técnicas y los grupos de Carman y col. (1983, 1985), Cowan y Powell (1966) dedicaron grandes esfuerzos para estudiar esta vía. Acerca de los posibles neurotransmisores, no existe aún ningún método inmunohistoquímico ni histoquímico para identificar rutas de glutamato en el cerebro, ni tampoco ningún antagonista específico que sea satisfactorio. McGeer et al, (1977) y Divac et al, (1977) han lesionado la vía córtico-estriatal y han encontrado una disminución del 40-50 % en la captura de alta afinidad del glutamato en la fracción sinaptosomal del estriado. Por otro lado, no se puede descartar al aspartato como un posible participante de esta ruta, puesto que el glutamato y el aspartato mostraron idéntica afinidad en su captura por los sistemas de alta afinidad (McGeer et al, 1979). Sin embargo en el estriado existe una relación de 6:1 en el contenido de glutamato y de aspartato, lo que sugiere que esta vía podría ser exclusivamente glutamatergica; aunado a que las lesiones en esta ruta producen una disminución del nivel del glutamato en el cerebro, pero no de otros aminoácidos (Kim et al, 1976).

Usando técnicas de marcaje con peroxidasa de raíz fuerte se han observado proyecciones interhemisféricas al estriado que surgen de células de las capas III, IV y V de la corteza rostral (Kitai et al, 1976; Jones et al, 1977).

### Núcleos Intralaminares del tálamo.

Una de las aferentes importantes al estriado es la que viene de los núcleos intralaminares del tálamo. Esta vía está topográficamente organizada y su existencia ha sido demostrada con estudios de degeneración retrógrada (Powell y Cowan, 1956), degeneración anterógrada (Mehler, 1966) y marcaje retrógrado con HRP (Nauta et al, 1974). Los neurotransmisores de esta proyección aún no están claramente establecidos (McGeer et al, 1984).

### Núcleos del rapé.

Una ruta serotoninérgica al estriado surge en el rapé dorsal. Las células de origen de este tracto son neuronas del grupo B 9 en el rapé dorsal descritas por Dalstrom y Fuxe en 1964. En esta vía se han hecho estudios de degeneración aplicando toxinas específicas para la serotonina como la p-cloranfetamina con lo que se la ha podido rastrear en todo su trayecto (Hattori et al, 1976). Recientemente se han demostrado células de este núcleo que no contienen serotonina, pero que también proyectan al estriado (Trulsson, et al, 1985).

### Sustancia Negra.

El sistema aferente más estudiado es la proyección dopaminérgica nigro-estriatal, demostrada por primera vez en 1964, con estudios de histofluorescencia, realizados por el grupo sueco (Dalstrom y Fuxe, 1964; Öndén et al, 1964, 1965). Posteriormente, Ungerstedt (1971) mostró que esta vía puede ser dividida en dos partes: la vía dopaminérgica nigro-estriatal

originada en la parte compacta de la sustancia negra y que proyecta al estriado, y una vía dopaminérgica mesolímbica originada en las células mediales de la parte compacta de la sustancia negra, que termina principalmente en el núcleo del tubérculo olfatorio.

Kitai et al, (1976) han mostrado la existencia de fibras a la sustancia negra, a los núcleos intralaminares del tálamo y a la corteza que convergen monosinápticamente en neuronas de la proyección estriatal. Las células de la sustancia negra fueron caracterizadas por estimulación antidrómica y demostradas anatómicamente inyectando HRP. En la rata, se ha visto que las células que dan origen a la proyección nigro-estriatal son neuronas de tamaño medio con un diámetro aproximado de 15  $\mu$ m, ovales y multipolares (Faull y Mehler, 1978). Esta vía ha sido posteriormente estudiada empleando métodos tan diferentes como la técnica del ácido glioxílico para catecolaminas (Lindvall y Bjorklund, 1974), inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (Pickett et al, 1976) y lesiones con 6-OHDA (Mahler et al, 1973). La conclusión de todos estos experimentos parece general y dice que las células que componen esta vía, son dopaminérgicas.

Otros.

Se han descrito fibras provenientes del globo pálido que terminan en el cuerpo estriado cuyo neurotransmisor se desconoce (Arbutnot et al, 1982; McCler et al, 1984).

## Eferentes.

El principal blanco de las proyecciones eferentes estriatales es la sustancia negra reticulada (SNR). En estudios de degeneración se ha confirmado esta vía (Hauta et al, 1978). Estudios de microscopía electrónica indican que las fibras mielinizadas procedentes del estriado terminan en dendritas de la sustancia negra compacta que invaden la porción reticulada (Grofová y Rinvik, 1970; Hattori et al, 1975). Inyecciones de HRP han mostrado que las células tipo II de tamaño medio "con espinas" son las que se marcan inyectando la enzima en la SNR (Grofová, 1975; Bunney y Aghajanian 1976).

La sustancia negra y el globo pálido contienen un alto nivel de GABA y de la enzima determinante de la síntesis del aminoácido: la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) (Chalmers et al, 1970). Interrumpiendo la vía estriado-nigral con un corte o con una lesión localizada, se disminuye el nivel de GAD en la SNR y en el globo pálido (García-Munoz et al, 1977; Fonnum et al, 1978). Además, en elegantes trabajos de tinción inmunocitoquímica para GAD se ha establecido la existencia de terminales GABAérgicas en la SNR (Ribak et al, 1977). Esto ha sugerido que la ruta descendente estriado-nigral se extiende del estriado caudal al globo pálido y desemboca en la SNR. Además, Kim et al (1971) han sugerido que la ruta descendente del estriado a la sustancia negra extiende ramificaciones axonales al globo pálido. McGeer et al (1973) y Fonnum et al (1978) encontraron que al interrumpir la conexión entre el estriado y el globo pálido la actividad de la GAD disminuía en el globo pálido.

Se ha utilizado la inmunocitoquímica para visualizar encefalinas tanto en el estriado como en el globo pálido. Mucha de la linción encontrada en el globo pálido parece pertenecer a terminales nerviosas con cuerpos localizados en el estriado (Watson et al, 1977). Se ha encontrado además, que el nivel de encefalinas disminuye en el globo pálido después de lesionar el caudado (Hong et al, 1977a).

Por otro lado, mediante lesiones del tracto estriado-nigral se ha demostrado también, disminución en los niveles de Sustancia P en la sustancia negra (Kanazawa et al, 1977). Los cuerpos de las células con Sustancia P están localizados en el estriado rostral. Asimismo se ha descartado la pérdida del péptido en la sustancia negra reticulada después de inyecciones de ácido kainico en la parte anterior del estriado (Hong et al, 1977a ; Del Fiaco et al, 1982; Otsuka y Konishi, 1983). Recientemente se ha demostrado que hay neuronas en la SMC reciben botones sinápticos que contienen sustancia P (Kawai et al 1987).

## 2).- GLOBO PÁLIDO.

Este núcleo está formado principalmente por células de tamaño grande, muchas de ellas con forma de huso y dendritas largas. También se han descrito neuronas pequeñas con pocas dendritas (Fox et al, 1974). El globo pálido es una de las principales estructuras que recibe fibras de salida del estriado (Papez, 1941). En todas las especies, el globo pálido está dividido en dos partes principales: el pálido interno y el pálido externo. En los roedores, carnívoros y otros mamíferos no

primates, el equivalente del pálido interno es llamado núcleo entopeduncular (Graybiel et al, 1987). La distinción entre los dos segmentos del globo pálido es importante pues aunque sus conexiones aferentes son similares, los dos segmentos tienen distintas conexiones eferentes.

El globo pálido, como el núcleo entopeduncular y la sustancia nigra, contienen una concentración muy alta de neuronas GABAérgicas, distribuidas dorso-caudalmente (Nagai y McGeer, 1983).

#### Aferentes.

La conexión más importante de fibras al globo pálido procede del estriado, la otra aferencia clara procede del núcleo subtalámico. La aferencia estriatal termina en ambos segmentos del globo pálido. Como ya se mencionó, la vía estriado-palidal utiliza GABA, encefalinas y posiblemente Sustancia P (De Fiacco et al, 1982; McGeer et al, 1984), el transmisor usado por la conexión del núcleo subtalámico no se conoce (McGeer et al, 1984). También se han reportado aferentes del núcleo accumbens al globo pálido que usan GABA como neurotransmisor (Scarnati et al, 1983).

#### Eferentes.

##### Del Globo Pálido Externo (o Globo Pálido mismo).

Existe una conexión masiva del globo pálido externo al núcleo subtalámico (Nauta y Mehler, 1966; Carpenter y Strominger, 1976) para la que se postula al GABA como el neurotransmisor

utilizado (McGeer et al, 1984).

Utilizando las técnicas de autoradiografía para microscopía de luz y para microscopía electrónica, Heltori et al (1975) presentaron evidencia de una proyección del globo pálido externo hacia las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNC). McGeer et al (1973) postularon al GABA como el candidato a transmisor de esta proyección. Realizando un corte entre el globo pálido y la sustancia nigra compacta o lesionando el globo pálido, se ocasiona una disminución en la actividad de la GAD en la sustancia negra (McGeer, et al, 1973). También se ha reportado una conexión del globo pálido al estriado cuyo neurotransmisor se desconoce (Gerfen et al, 1982).

#### Del Globo Pálido interno (o Núcleo Entopeduncular).

La principal proyección de este núcleo en la rata va hacia el tálamo, principalmente al núcleo ventro-medial (VMT). No se conocen los transmisores en esta vía (McGeer et al, 1984).

Con experimentos de degeneración de fibras, Hauta y Mehler (1966) documentaron la existencia de una vía pálido-lemniscal. Experimentos recientes circunscriben esta proyección al núcleo pedunculo pontino (Graybiel 1979). También existen pruebas de una ruta del globo pálido interno al campo prerubral o núcleo del campo de Forel, conocida como la vía pálido-prerubral (Graybiel y Ragsdale, 1979) . Fibras pálido-habenulares han sido descritas utilizando principalmente marcaje retrógrado con HRP y se indica que es la habénula lateral el núcleo que recibe a estas fibras de proyección (Herkenham y Hauta, 1977).

### 3).- SUSTANCIA NEGRA.

Fue descrita por primera vez en 1867 por Vicq d'Azyr, recibió este nombre por la pigmentación característica que muestra como resultado de una alta concentración de neuromelanina, la dopamina.

La sustancia negra ha sido dividida en dos partes: una parte dorsal con cuerpos celulares bastante juntos llamada sustancia negra compacta (SNC) y una sección larga y ventral, llamada sustancia negra reticulada (SNR) en la cual las neuronas están dispersas. La dopamina, en contacto con el paraformaldehído cambia su estructura de tal forma que se vuelve fluorescente cuando le incide la luz ultravioleta. Gracias a esta técnica se supo que en la SNC se encuentran muchas neuronas que sintetizan dopamina (Dahlstrom y Fuxe, 1964; Fallon y Moore, 1978).

Las interacciones sinápticas que ocurren dentro de la sustancia negra son muy complejas. A la SNR llegan innumerables dendritas de las células de la SNC, dendritas que se ha demostrado contienen y liberan dopamina (Cuello y Iverson, 1978; Cheramy et al, 1981). Se ha visto que la dopamina liberada de las dendritas inhibe tónicamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas vecinas, a través de contactos dendrodendríticos (Cheramy et al, 1981). También se ha propuesto que la liberación de dopamina en la SNR puede modificar la liberación del neurotransmisor de las fibras aferentes a la SNR a través de contactos dendroaxónicos (Dray et al, 1976).

## Aferentes

### À la Sustancia Negra Compacta.

Existen datos aunque controvertidos, de la existencia de aferentes de la amígdala a la SNC. Se ha visto que utilizando inyecciones de HRP en la SNC del mono, aparecen algunas células debilmente marcadas en la amígdala (Bunney y Aghajanian, 1976; Krettek y Price, 1978). Se ha descrito una aferencia a la SNC proveniente de la región preóptica lateral del hipotálamo (Conrad y Pfaff, 1976; Nauta y Domesick, 1978) para la cual Blavier et al, (1979) y Sofroniew (1980) sugieren a la oxitocina y a la vasopresina como transmisores.

Se postula una aferencia del núcleo del raqué dorsal a la SNC. Después de inyectar HRP en la SNC, aparece gran cantidad de células marcadas en el raqué dorsal (Bobillier et al, 1976; Azmitia y Segal, 1978). La mayoría de las neuronas estudiadas del raqué dorsal son serotoninérgicas, aunque existen células cuyo neurotransmisor no es la serotonina, y que se encuentran también en los núcleos del raqué (Trulsson, et al, 1985). Sin embargo, debido a la concentración de serotonina determinada en la SNC, se postula que esta vía sea predominantemente serotoninérgica (Ungersted, 1971a). Existe una aferencia que procede del núcleo tegmental pedunculopontino (Graybiel, 1977); estudios del grupo de McGeer indican que al menos la parte ipsilateral de la vía puede utilizar a la acetilcolina como la sustancia transmisora (McGeer et al, 1984). Esta vía se demostró con estudios de marcaje retrógrado con HRP (Dray et al, 1976).

También se discute sobre una conexión entre el globo pálido externo (Grofova, 1975; Hattori et al, 1975; Dunney y Aghajanian, 1976) o el globo pálido ventral (Kim et al, 1976) y la SNC usando como neurotransmisor al GABA y quizá a la Sustancia P.

Existen referencias a la SNC aún en discusión, como las provenientes de la corteza, que se postula utilizan como neurotransmisor al ácido glutámico, al GABA, o a ambos aminoácidos (Rinvik y Walberg, 1969).

#### A la Sustancia Negra Reticulada.

La mayor y quizá la principal ruta eferente del estriado proyecta ipsilateralmente hacia la sustancia negra y forma la vía estriado-nigra) (Voncida, 1960; Grofova, 1979). Esta vía surge de neuronas de tamaño medio con espinas (Somogyi et al, 1981). Muchas fibras estriado-nigrales hacen contactos axo-dendríticos en la sustancia negra del gato, pero en las ratas los botones axo-somáticos parecen ser más comunes (Hassler et al, 1975). Esta vía usa GABA, (García-Huñoz et al, 1977), Sustancia P (Otsuka y Konishi, 1983) y Dinorfina como neurotransmisores (Vincent et al, 1982; Zamir et al, 1983).

#### Eferentes

##### De la Sustancia Negra Compacta.

Existe una conexión nigro-estriatal de fibras que contienen dopamina, que se originan en la SNC o A9, estas fibras se encuentran junto con una vía minoritaria que proviene de áreas dopaminérgicas llamadas A 8 y A 10. Estas áreas (A8 y A10)

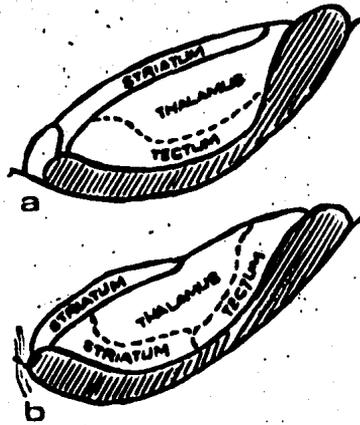


Figura 2.- Esquema tomado de Fauli y Mehler, 1978, que representa las eferentes de la sustancia nigra reticulada.

proyectan fundamentalmente a la corteza (Ungerstedt, 1971). El sistema dopaminérgico es uno de los más estudiados en el cerebro. Las vías dopaminérgicas fueron primero descritas por Dahlstrom y Fuxe, en 1964, usando el método histofluorescente para catecolaminas, desarrollado por Faick et al, en 1962. Estudios de marcaje retrógrado han demostrado que esta vía es fundamentalmente ipsilateral, pero con un componente menor que proyecta al lado contralateral (Pritchell et al, 1983; Conzelmann et al, 1985).

#### De la Sustancia Negra Reticulada.

Las eferentes de la sustancia negra reticulada son hacia el colículo superior, al núcleo ventro-medial del tálamo y hacia la formación reticular de la protuberancia (núcleo pedúnculo pontino) (Faulk y Mehler, 1978).

Las fibras nigro-tectales fueron demostradas por Faulk y Mehler en 1978, en estudios autorradiográficos se ha mostrado que las células de esta proyección están agrupadas en conjuntos dentro de la SNR, lo que podría indicar que también aquí existe una compartimentalización en por lo menos tres zonas: a) una que proyecta al tectum, b) una zona que proyecta al tálamo y c) otra que proyecta a la formación reticular pontina, (Figura 2). El GABA, es la sustancia utilizada por las fibras nigro-tectales. Al practicar lesiones en la SNR, se observó que la GAD disminuía en un 40% en el colículo superior ipsilateral (Vincent et al, 1978). Mediante autorradiografía se sugiere que las fibras nigro-tectales terminan, en grupos, en los dos tercios superiores del colículo superior (Graybiel, 1978).

Las fibras nigro-talámicas fueron descritas utilizando técnicas de transporte retrógrado y anterógrado (Graybiel, 1979). Se ha encontrado que usan al GABA como neurotransmisor (Hedreen y Chalmer, 1972). Cuando se lesiona la sustancia negra se produce una disminución en la actividad de la GAD y en la concentración de GABA en el núcleo ventro-medial del tálamo (DiChiara et al, 1979; Starr y Kilpatrick, 1981).

Las fibras de proyección al tálamo surgen de diferentes partes de la SNR (Faull y Mehler, 1978). El principal lugar de terminación de este tracto, en el mono, es la parte ventral-anterior del tálamo (Carpenter et al, 1976). Los estudios con HRP indican que se origina principalmente de células en la región lateral de la SNR (Carpenter et al, 1976). Estas neuronas tienen somas grandes y forman columnas, algunas poseen axones divergentes que conectan no sólo al tálamo, sino también al colículo superior; esto se demostró utilizando marcadores retrógrados fluorescentes (Bentivoglio et al, 1979). Un estudio electrofisiológico, indica que estas neuronas con colaterales a dos núcleos representan del 30-50 % del total de las células de la SNR (Deniau et al, 1978).

Las fibras nigro-tegmentales fueron descritas por primera vez por Cajal (1911). Según datos autorradiográficos recientes las fibras nigro-tegmentales terminan en la parte compacta del núcleo tegmento pedunculopontino (Graybiel, 1979). Con estudios neuroquímicos, se postula que el GABA es el transmisor en esta vía (Childe y Gale 1983).

Las conexiones eferentes de la SNR que no sólo proyectan ipsilateralmente sino que también tienen un menor componente

hacia el otro extremo del hemisferio cerebral son las que van al colículo superior y al tálamo. Este trabajo se llevó a cabo utilizando inyecciones en la sustancia negra reticulada de HRP conjugada con aglutinina de germen de trigo (MGN-HRP). Al procesar los cortes de tejido se visualiza la marca transportada anterograda y retrógradamente. (Gerfen et al, 1982).

#### 4).- NÚCLEO SUBTALÁMICO.

Este núcleo es la única parte de la región talámica con bordes citoarquitectónicos poco definidos. Sin embargo a pesar de su tamaño pequeño, este núcleo tiene regiones definidas de entrada y de salida (Carpenter et al, 1981).

#### Aferentes.

En estudios autorradiográficos se ha demostrado la existencia de una proyección de la corteza motora, al núcleo subtalámico (Martman von Monakow et al, 1978). Otra aferencia masiva al núcleo subtalámico proviene del globo pálido externo (Carpenter et al, 1981). en estudios con marcaje retrógrado y anterógrado en el gato, se ha mostrado la existencia de esta proyección (Graybiel, 1979). Algunos estudios propusieron al GABA como candidato a neurotransmisor en esta vía utilizando datos obtenidos con técnicas inmunohistoquímicas que revelaron alta actividad de la GAD (Fonnum et al, 1978).

## Eferentes.

La principal proyección de salida del núcleo subtalámico termina en ambos segmentos del globo pálido y en la parte ventral de la sustancia negra reticulada, como lo probó la evidencia aportada por estudios autorradiográficos (Haute y Cole, 1978; Van der Kooy et al, 1980).

## COMENTARIO GENERAL.

Los circuitos de conexión entre los ganglios basales son muchos, existe una interrelación profusa de los diferentes componentes del sistema en ambos hemisferios. Esto habla de que es muy probable que el daño en una de las estructuras del sistema, repercute en la actividad del resto de los componentes y que cualquier alteración en la transmisión, se deberá reflejar en un desequilibrio en el conjunto de estructuras.

Como se menciona en la sección sobre las conexiones aferentes a la SHR, la dinorfina es un péptido involucrado en la transmisión entre el estriado y la SHR. El estriado se ha visto como una estructura integradora de la información procesada en los ganglios basales, mientras que la SHR representa uno de los principales núcleos de salida del sistema (Deniau et al, 1978; Doudot et al, 1984). Por lo tanto, estudiar a los transmisores que se liberan en las vías aferentes a la SHR es de gran relevancia ya que estas sustancias van a afectar de diversa manera la neurotransmisión en la SHR y por lo tanto van a modificar la integración que se realiza en este núcleo lo que finalmente se va a traducir en un comportamiento motor, función

primordial de los ganglios basales.

No se han estudiado los correlatos electrofisiológicos, de los cambios observados por la aplicación de dinorfina, en la SNR. Nuestro interés ha sido estudiar dichos cambios electrofisiológicos en las células de la SNR consecutivos a la aplicación del péptido. Es importante agregar un párrafo que precise mejor los datos acerca de la existencia de la vía dinorfinérgica estriado-nigral. Vincent et al (1982) demostraron la existencia de la vía mediante inmunohistoquímica. En las ratas control se aprecia una densa malla de fibras inmunoreactivas al péptido dentro de la zona reticulada de la sustancia negra, que se extiende a la zona compacta del mismo núcleo y cubren toda el área de la SNR, variando un poco su concentración presentando gran inmunoreactividad en la parte lateral y medial de la SNR y bandas de fibras fuertemente fluorescentes adyacentes al cruz cerebri, cuando se inyectó ácido iboténico en la cabeza del caudado, se observó una marcada disminución en el número de fibras inmunoreactivas en la SNR del lado lesionado. Palkovitz et al (1984) con el objeto de determinar la fuente y la topografía de la vía estriado-nigral dinorfinérgica lesionaron en 10 diferentes sitios del estriado. Ellos encontraron que después de realizar cortes a nivel del ansa lenticularis, esto es en la cabeza del caudado, los niveles de dinorfina decaen notablemente (hasta un 80%), también concluyen que el origen y curso de los axones que transportan el péptido parece ser similar a aquellos que contienen GABA y sustancia P. Fallon et al (1985) en un estudio realizado con inmunoreactividad encuentran que la

principal aferencia de dinorfina a la SHR viene del caudo-putamén , sin embargo las aferencias a la SHC surgen de la amígdala central y del hipotálamo. Acerca de la salida de fibras de dinorfina de la SHR no se sabe aún casi nada. Antes de pasar a la sección experimental, es conveniente revisar algunos de los datos sobre la distribución y acción de este péptido en el sistema nervioso.

#### CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS DE LA DINORFINA.

La dinorfina es un potente péptido opioide que fue aislado y secuenciado por Goldstein et al en 1979.

La familia opioide de los péptidos deriva de tres productos genéticos diferentes, la proencefalina A, precursor de péptidos relacionados con la Met-enkefalina y la Leu-enkefalina; la proencefalina B (prodinorfina) precursor de la dinorfina y de la alfa-neo-endorfina y la pro-opiomelanocortina precursor de la beta-endorfina y de algunos péptidos no opioides, como la adrenocorticotropina (ACTH) (Kakidani et al, 1982). Los tres precursores dan lugar cuando menos a 16 diferentes péptidos opioides activos. Los procesos proteolíticos para cada uno de los tres precursores parecen estar regulados de una manera distinta en los diferentes tejidos y regiones del cerebro (Weber et al, 1983). Parece ser que los tres precursores de los opioides pueden generar péptidos con diferentes longitudes de cadena.

La proencefalina B o prodinorfina es una proteína precursora compuesta de 256 aminoácidos y que contiene la secuencia de la beta-neo-endorfina, la dinorfina y la Leu-enkefalina en su región carboxilo terminal. Se le llamó "B" para distinguirla de la

		1	5	
Dinorfina-32	(H)	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lis-		
			17	20
		Leu-Lis-Trp-Asp-Asn-Gln-Lis-Arg-Tir-Gli-Gli-		
				32
		Fen-Leu-Arg-Arg-Gln-Fen-Lis-Val-Val-Tri (OH)		

Figura 3.- La secuencia 1-17 corresponde a la dinorfina A y la 20-32 a la dinorfina B. Nótese que la dinorfina A contiene la secuencia (1-5) de la Leu-encefalina. (Datos tomados de Fischli et al, 1982).

proencefalina aislada del tejido adrenal, llamada desde entonces proencefalina A (Kakidani et al, 1982).

La dinorfina se aisló originalmente de la pituitaria del puerco (Goldstein et al, 1979), inicialmente como un tridecapéptido. Posteriormente Fischli et al (1982), describieron una dinorfina de 4,000 daltones, que contenía 32 aminoácidos. Contenido en la secuencia de los 32 aminoácidos se encuentra, en la región amino terminal, un heptadecapéptido llamado desde entonces dinorfina A (1-17), y en la región carboxilo terminal, el tridecapéptido previamente descrito, al cual se le denominó dinorfina B (1-13). La dinorfina B tiene la misma secuencia 1-7 que la dinorfina A, pero la diferencia estriba en que tiene a la lisina en la posición 10 en lugar de la posición 11 de la dinorfina A. La dinorfina A contiene la secuencia de la leu-encefalina (Figura 3). Con métodos inmunohistoquímicos, se ha demostrado que la dinorfina B tiene una distribución más amplia que la dinorfina A, en el cerebro de la rata (Weber y Barchas, 1983).

Si se compara la distribución relativa, en el cerebro, de los productos de la pro-dinorfina, se observa diferente procesamiento proteolítico. Uno de los principales productos es la dinorfina 1-8 y ésta se deriva de la dinorfina A. Si se comparan las concentraciones de las dos dinorfina (A y 1-8) a través del uso de anticuerpos altamente específicos para cada una, se observa que la concentración en molas de los dos péptidos no es constante en el cerebro. En el estriado por ejemplo, la conversión de dinorfina A, a dinorfina 1-8 es mucho más completa, que en la

médula espinal o en el lóbulo neural de la pituitaria. Esto es, en el estriado, toda la dinorfina A se procesa a dinorfina 1-8, en cambio en las otras estructuras, solamente una parte de dinorfina A es convertida en dinorfina 1-8, quedando gran cantidad del péptido en forma de dinorfina A (Meber et al, 1983).

Midiendo inmunoreactividad a los diferentes péptidos en el tejido nervioso de la rata y caracterizando a éstos con cromatografía líquida de alta presión (HPLC), se ha establecido que tanto la alfa-meo-endorfina, como la beta-meo-endorfina, la dinorfina 1-8, la dinorfina A y la dinorfina B, están presentes en el cerebro de la rata, así como también la dinorfina 32 (Cone et al, 1983).

El concepto de varios receptores a opiáceos viene de los estudios pioneros de Martin y su grupo (1976) sobre la acción de los opiáceos en la médula espinal del perro. Usando estos datos, junto con los estudios de contacto in vitro, las preparaciones de músculo liso (Lord et al, 1977) y los estudios clínicos (Houde, 1979), se creó la siguiente clasificación de receptores a opiáceos:

RECEPTOR	PRODUCTO ENDOGENO PROPUESTO	AGONISTA
Mu	morfina	morfina dihidroximorfina
Delta	Met-enkefalina Leu-enkefalina	Delta-D-leucina D-ser-L-leu- encefalina-Thr
Kappa	dinorfina	etilcolocilazocina NR-2084
Epsilon	beta-endorfina	beta-endorfina
Sigma	Leu-enkefalina Met-enkefalina	SKF-10047 8-Heloxicidazocina.

(Wood, P.L., 1981).

La naloxona es el antagonista clásico y específico para los receptores opioides.

La dinorfina actúa a través de un tipo de receptor específico, diferente al de otros péptidos opiáceos como los Mu y Sigma. Se postula que el receptor para la dinorfina sea del tipo kappa. Los estudios se han realizado en el plexo mesentérico del cobayo, que contiene receptores opioides mu, kappa, pero no sigma (Chavkin, et al, 1982a). Como los receptores mu, kappa difieren en su sensibilidad al antagonista opioide naloxona, se pueden diferenciar. Cuando se aplica un agonista, o el ligando endógeno para estos receptores, en el ileo del cobayo, se requiere más naloxona para revertir la actividad inhibidora de los agonistas kappa que para revertir la misma actividad de los agonistas mu (Hutchinson et al, 1975).

Se ha observado que tanto la etilcolocilazocina, que es un agonista representativo para receptores kappa, así como la dinorfina B, deprimen significativamente las contracciones producidas eléctricamente en el plexo mesentérico de cobayo (Oka

et al, 1982). También se ha reportado que la dinorfina inhibe significativamente las contracciones producidas eléctricamente en el conducto deferente de conejo, (Chavkin et al, 1982b). Se ha mostrado que el conducto deferente contiene exclusivamente receptores kappa y que la potencia inhibitoria del péptido, depende del tiempo que esté en contacto con la preparación. En esta misma preparación, los agonistas a otros receptores como mu, delta o sigma no inhiben las contracciones (Chavkin et al, 1982). Así pues, se ha concluido que la dinorfina 1-8 y posiblemente la dinorfina 1-9, sean los ligandos endógenos para los receptores kappa (Corbett et al, 1982).

En estudios electrofisiológicos situados en el hipocampo de la rata, se ha demostrado que los agonistas a los receptores mu y sigma causan predominantemente excitación de las neuronas, mientras que los agonistas a receptores kappa, causan depresión de la actividad (Brookes y Bradley, 1984). Ambos efectos son antagonizados por la naloxona, indicando que son efectos mediados por receptores a opiáceos. Sin embargo, existen datos contradictorios desde el punto de vista electrofisiológico, respecto al efecto producido por la aplicación de dinorfina en el hipocampo: Henriksen et al, (1982) encontraron que la aplicación microelectroforética de dinorfina, alfa-neo-endorfina, dinorfina 1-13 y dinorfina 1-8 excitan a un 67% de las neuronas muestreadas, siendo éste un efecto bloqueado por la naloxona. Mientras que un 12% de las neuronas restantes muestran una inhibición y algunas más, muestran una breve respuesta inhibitoria seguida de una respuesta excitadora. El grupo de Chavkin (1983b)

describe que la administración de dinorfina en las neuronas de la capa CA 1 del hipocampo incrementa el tamaño de las espigas producidas por estimulación ortodrómica de las colaterales de Schaffer. Esto ha llevado a pensar, que el efecto de la dinorfina consiste en aumentar la excitabilidad de algunas células del hipocampo. En otro trabajo del mismo grupo (Chavkin et al, 1985), realizado también en rebanadas de hipocampo y con el péptido agregado al líquido de perfusión, se muestra que el opioide incrementa la sensibilidad de las células piramidales (CA 1) a la estimulación eléctrica, y que el efecto es bloqueado por la naloxona. En este caso los autores concluyen que el incremento en la sensibilidad es debido a la dinorfina y que este péptido podría estar normalmente involucrado en la regulación de la excitabilidad de la capa de células piramidales CA 1. Sin embargo, Brookes y Bradley (1981), en estudios realizados en ratas y con la dinorfina 1-13 aplicada por iontoforesis, encontraron que de 18 células registradas, la actividad en 39 fue deprimida, 1 células se excitaron y 5 no sufrieron ningún cambio. De estos datos, se concluyó que existen distintas poblaciones de neuronas en el hipocampo caracterizadas por una respuesta diferente a la administración del péptido. Se ha propuesto que una inhibición producida por la dinorfina sobre las interneuronas GABAérgicas existentes en este núcleo, podría llevar al efecto neto observado, consistente en excitación. En otras estructuras, como en las células mitrales del bulbo olfatorio y en las aferentes primarias de la médula espinal, se ha descrito también el fenómeno de excitación producida por la aplicación de dinorfina, sugiriéndose que la desinhibición puede ser un meca-

nismo general importante de la acción de los opioides en el sistema nervioso central (Hicoll et al, 1980). El mismo grupo también sugiere que las interneuronas inhibidoras GABAérgicas son el blanco primario de los sistemas de fibras que contienen encefalinas.

En cultivos de células del ganglio de la raíz dorsal, utilizando técnicas de registro intracelular, se ha observado que la dinorfina aplicada localmente mediante un sistema de presión de aire, disminuye la duración del potencial de acción. Se postula que este potencial se produce por la entrada de calcio, ya que aún en presencia de TTX que es un bloqueador de canales de sodio, el evento se sigue presentado con las mismas características de duración y forma de la espiga; se sugirió que el receptor a la dinorfina, en estas células, podría estar acoplado a un canal de calcio dependiente de voltaje (Wertz y McDonald, 1981).

En estudios farmacológico-conductuales, se ha visto que la dinorfina puede estar involucrada en procesos epilépticos crónicos "kindling" (Prochowicki et al, 1983). Por ejemplo, cuando se provocan ataques por estimulación subumbral repetida, en la amígdala del conejo, existe un aumento en la inmunoreactividad a la dinorfina que no se observa en conejos no estimulados utilizados como control. Este aumento aparente en la concentración del péptido, sólo parece tener lugar en el sistema límbico y persiste por lo menos un mes. Quizá esto pueda hablar del papel que juega el péptido en mantener el proceso de epilepsia, inducida por estimulación subumbral repetida. Se

propone que tal vez la dinorfina sea liberada durante la ocurrencia de los ataques o que quizá sean éstos, los que incrementan la utilización de la dinorfina. Por otro lado, Przewlocka et al (1983) describen que la dinorfina y la activación de los receptores kappa tienen acción anticonvulsiva. Cuando a ratas macho se les inyecta por vía venosa el agente convulsivante pentilentetrazol 5 minutos después se les administra dinorfina intraventricularmente, el péptido reduce significativamente los ataques clónicos. Este efecto es antagonizado por la naloxona.

También se ha encontrado que la aplicación de dinorfina en el tectum de la rata produce parálisis de las extremidades superiores y una reducción en las respuestas nociceptivas. Esta parálisis es parcial, está relacionada con la dosis y se revierte espontáneamente. La parálisis no se presenta cuando se administran análogos de las encefalinas con alta afinidad por receptores mu o sigma (Faden y Jacobs, 1984).

La administración directa de dinorfina en la SNR de ratas causa una anomalía locomotora. Se produce giro contralateral, cuya intensidad depende de la dosis. Los fragmentos de dinorfina 1-17, 1-8, 6-17 y 1-13 inducen giro, siguiendo un orden decreciente en cuanto a su efecto (Herrera-Marchitz et al, 1984).

Utilizando técnicas de inmunorreactividad, se han aportado datos indicativos de que la vía estriado-nigral utiliza no sólo GABA y Sustancia P como neurotransmisores, sino también dinorfina (Vincent et al, 1982). Zamir et al, (1983) con el empleo de técnicas de inmunorreactividad con anticuerpos específicos, se ha mapeado la distribución de la dinorfina en el

sistema nervioso central y en este caso, la sustancia nigra ha sido uno de los núcleos con mayor inmunorreactividad al péptido. Según Weber y Barchas (1983) otros sitios con alto contenido de fibras y terminales inmunorreactivas a la dinorfina, aunque en cantidades menores que en la SNR son: el núcleo del tracto solitario, la estria terminalis y las fibras musguzas del hipocampo. En el hipotálamo, los siguientes núcleos presentan una pequeña cantidad de inmunorreactividad: lateral, dorsomedial, supraóptico, paraventricular, núcleos periventricular y anterior. También se encuentra dinorfina en la cápsula interna y en el núcleo entopeduncular; en el globo pálido y en el núcleo accumbens. Se observan somas inmunorreactivos en: la amígdala, el hipotálamo, el núcleo accumbens, la corteza y el estriado (Vincent et al, 1982; Weber y Barchas, 1983).

En las ratas, se ha observado una densa malla de fibras inmunorreactivas a la dinorfina, provenientes del estriado, que proyectan a la sustancia nigra (Vincent et al, 1982). La distribución de la inmunorreactividad en la SNR varía, se observa una alta concentración en la parte medial y lateral. Después de la inyección de ácido ibotónico en la cabeza del caudado, se observa una marcada disminución de fibras inmunorreactivas en la SNR del lado lesionado, por lo tanto, en el sistema descendente estriado-nigral la dinorfina parece representar otra sustancia transmisora o moduladora.

El interés de este trabajo se ha centrado en estudiar el efecto de la aplicación de dinorfina, sobre la actividad

eléctrica de las células de SHR. Debido a que la dinorfina parece participar en el sistema de neurotransmisores del estriado hacia la SHR, y este núcleo representa una de las principales vías de salida del circuito de los ganglios basales; núcleos relacionados con el control del movimiento voluntario e involuntario (Sanderson, et al, 1986). En estudios clínicos sobre enfermedades como el Parkinson y la corea de Huntington, se ha destacado la importancia de la integridad de estos núcleos para la actividad motora normal. Es muy probable que la dinorfina juegue un papel importante en la regulación de la transmisión de información proveniente del estriado, quizá pueda influir de alguna manera en la información que sale a través de la SHR. Por lo tanto, se consideró relevante como un primer paso hacia la caracterización de su acción, en este complejo sistema, el estudiar el efecto de la administración local de dinorfina sobre la actividad celular en la SHR.

## II.- SECCION EXPERIMENTAL.

### A).- Introducción.

El descubrimiento de la importante participación de los péptidos en el sistema de neurotransmisores de los ganglios basales ofrece un nuevo elemento a considerar. Hay que hacer notar que existe una gran variedad de péptidos en los ganglios basales. Por ejemplo, la Sustancia P se encuentra en la vía estriado-nigral (Otsuka y Konishi, 1983) y las encefalinas (Met-enkefalina y Leu-enkefalina) se han encontrado en las fibras estriado-palidales (DeFiacco et al, 1982). El papel fisiológico de los opiáceos es actualmente materia de discusión: preguntas relativas al mecanismo de regulación de estas sustancias en la liberación de neurotransmisores, su acción como modificadores de las propiedades de membrana de las células receptoras y el cómo podrían regular el efecto del neurotransmisor sobre las células blanco, son algunos de los grandes problemas de las neurociencias. Aún más si se piensa que los péptidos pueden estar actuando no sólo como neurotransmisores en el sentido clásico de la palabra, sino que pueden estar siendo liberados junto con un neurotransmisor y de esta manera estar modificando el efecto que la sustancia transmisora tuviera por sí sola (Lundberg y Hookfelt, 1983). Se sabe también que el efecto de los péptidos es de larga duración (minutos) comparado con el efecto de los neurotransmisores clásicos (segundos o menos) y esto puede ser otro factor que modifique la respuesta en la neurona blanco.

La dinorfina es parte de esta familia de péptidos opioides; para denotar su extraordinaria potencia, se le denominó din del

griego dinamis que significa poder. En el flico del cobayo es aproximadamente 700 veces más potente que la Leu-enkefalina. Sus efectos en este tejido son bloqueados completamente por la naloxona, pero la aparente afinidad de la naloxona es 1/13 parte de la que bloquea a la Leu-enkefalina. En el vas deferens del ratón, la dinorfina es 3 veces más potente que la Leu-enkefalina (Goldstein et al, 1979). La dinorfina se encuentra distribuida en todo el sistema nervioso central, aunque no de manera homogénea (Heber y Barchas, 1983). Uno de los sitios con más alta concentración, es la sustancia negra reticulada (SNR) (Zamir et al, 1983).

La SNR es un núcleo cuya participación en la expresión motora ha sido ampliamente estudiada (Drey, 1979; García-Muñoz, 1983). Este núcleo se considera un sitio importante para la salida de la información procesada en los ganglios basales tanto desde un punto vista analómico, como conductual (García-Muñoz et al, 1977; Fauli y Mehler, 1978; Patiño y García-Muñoz, 1985). Como ya se mencionó en la introducción general (sección de eferentes de la SNR), la SNR posee tres eferentes principales: el núcleo ventro-medial del tálamo, el colículo superior y la formación reticular pontina (Deniau et al, 1978 a y b; Guyenet et al, 1978; Fauli y Mehler, 1978). Los estudios electrofisiológicos y bioquímicos han mostrado que al menos las eferentes nigrales hacia el colículo superior y al núcleo ventro-medial del tálamo, pueden en algunos casos, estar constituidas por colaterales de la misma neurona (Anderson et al, 1977; Deniau et al 1978a). El neurotransmisor contenido en estas vías es inhibitor, se ha postulando al GABA como la sustancia utilizada (Hagy et al, 1978;

Dichans et al, 1979).

Como se ha mencionado (sección de anatomía correspondiente al estriado) la vía estriado-nigral representa la principal aferencia a la SNR, y utiliza como neurotransmisores al GABA (García-Hunoz et al, 1977), a la Sustancia P (Otsuka y Konishi, 1983) y a la dinorfina (Vincent et al, 1982). Se sabe que el GABA es el neurotransmisor inhibitor por excelencia (Florey, 1961) y que la sustancia P es un péptido que produce excitación de las neuronas de SNR (Otsuka y Konishi, 1983). Aunque se ha estudiado el efecto de la dinorfina en otras regiones del cerebro, no se sabe cuál es su efecto sobre la actividad eléctrica de las células de la SNR, aun siendo este núcleo uno de los sitios con mayor concentración del péptido.

En este trabajo se decidió estudiar el efecto de la dinorfina sobre la actividad eléctrica de las células de la SNR.

La hipótesis propuesta predice que la aplicación local de dinorfina debe disminuir el patrón de disparo de las células de la SNR. Esto se postula porque en sistemas diferentes, como el hipocampo se había estudiado el efecto de la aplicación de la dinorfina (Brookes et al, 1981), mostrándose que el péptido disminuye la frecuencia de disparo de la mayoría de las células estudiadas. Además, existen datos de que en general los péptidos hiperpolarizan a las neuronas (Barker et al, 1978; Nicoll et al, 1980).

## B).- MATERIAL, METODO Y PROCEDIMIENTO.

### a) Animales y procedimiento de anestesia.

Se realizaron experimentos agudos en ratas macho albinas de la cepa Wistar, con pesos entre 250 y 260 g. Para iniciar la anestesia los animales se depositan en un recipiente de plástico cerrado conectado a una manguera por la que circula halotano (ICI) (2 %). El nivel de anestésico se controla mediante un vaporizador (Dräger) por el que circulaba una mezcla de O<sub>2</sub> - CO<sub>2</sub> (95% - 5% respectivamente).

Una vez anestesiado el animal, se le practicó una traqueostomía y se le fijó una cánula plástica en forma de "Y". Una salida de la cánula conecta a la manguera por la que circula la mezcla del anestésico O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> y la otra salida a un extractor de vacío que ayuda a mantener constante el nivel de anestesia (0.8-0.6% durante el registro). El excedente de anestesia expelido por el animal se pasó a un recipiente que contiene aceite mineral en el que se disuelve el halotano. La temperatura corporal se mantuvo a 36-37 grados centígrados mediante colchones de agua caliente cambiados regularmente.

### b).- Cirugía, materiales y equipo para realizar el registro electrofisiológico.

Cuando la intubación traqueal se completaba el animal era fijado a un aparato estereotáxico (David Kopf 7000).

El registro extracelular unitario se efectuó en la parte reticulada de la sustancia negra. El trépano se realizó con las

# DIAGRAMA GENERAL DEL SISTEMA DE REGISTRO

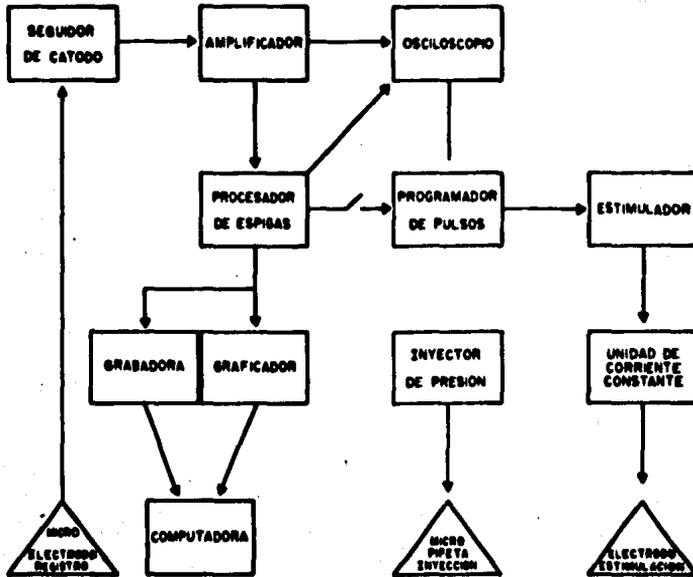


Figura 4.- Diagrama del sistema de registro. El arreglo de las conexiones se indica en el diagrama.

siguientes coordenadas estereotáxicas tomando la sutura Bregma como referencia: posterior 5.3 mm, lateral -1.60 mm. La barra de los incisivos se fijó a -2.5 mm.

El registro se realizó con microelectrodos de vidrio (A-H Systems Inc. No. 6030) obtenidos con un estirador de pipetas (David Kopf modelo 700 C). Los electrodos con una punta de 1.2 mm de diámetro, se llenaron con una solución de azul de Pontamina al 2% en acetato de sodio 0.5 N. La impedancia de los electrodos fue de 10-18 Mohms medida a 100 Hz con un probador de resistencias (Winston Electronics BL-100). El electrodo tenía unido por la punta, mediante pegamento (Loctite) una micropipeta de inyección (sistema de doble barril) (ver sección h). Los electrodos se introdujeron con un micromanipulador hidráulico (David Kopf 607 W) hasta una profundidad de 7.0-8.5 mm a partir de la superficie cortical. Para llevar a cabo los registros control localizados en la SHC, se tomaron las mismas coordenadas estereotáxicas que para la SHR exceptuando el nivel vertical que fue de 6.5 - 7.0 mm.

Para el registro eléctrico se utilizó el siguiente equipo (Figura 4): El microelectrodo de registro se conecta mediante un alambre de plata clorurado el cual crea una unión no polarizada y libre de ruido con la solución iónica en el electrodo (Skinner, 1975). El alambre de plata se conecta a un preamplificador, antiguamente llamado "seguidor de cátodo". El preamplificador tiene una impedancia de entrada muy alta (alrededor de 100 Mohms), una ganancia de uno y una impedancia de salida baja (150 ohms) (Grass Instr. HIP 511 E). Este a su vez, está conectado a un amplificador de corriente alterna (AC, Grass Instr. P 511 J).

Los filtros que se utilizaron en este amplificador fueron 100 Hz para el de baja frecuencia, (este filtro sirve para remover el componente AC llevándolo a tierra a través del capacitor) y 0.3 Hz para el de alta frecuencia ( éste es un circuito acoplado-AC que utiliza las cualidades del capacitor que por tener una baja impedancia para señales de alta frecuencia y una alta impedancia para frecuencias bajas permite pasar señales de alta frecuencia rechazando las de baja frecuencia). La amplificación utilizada fue generalmente de 50-100 veces. La señal del amplificador se envió a un osciloscopio (Tektronix 5113). La base de tiempo del osciloscopio generalmente se fijó en 5 mseg/división, valor que permitió tener un panorama completo del evento registrado, además de incluir lo que sucede un poco antes y un poco después de la estimulación, en caso necesario.

La señal amplificada se conectó también a un procesador de espigas (Digitimer D 130) con un nivel seleccionable de voltaje o ventana, para digitalizar la señal. Esto es, cada vez que una señal cruza el nivel seleccionado se genera un pulso cuadrado en el procesador. La ventana es monitoreada en el osciloscopio y ajustada cuando se requiere. La señal digitalizada está conectada a una bocina y a un contador, el cual cada 1.25 seg produce un pulzo eléctrico con un voltaje proporcional al número de pulsos acumulados en ese tiempo. Esta señal se envía a un graficador (Cole-Parmer) para obtener histogramas de frecuencia.

En algunas ocasiones se tomaron fotografías de la pantalla del osciloscopio. La memoria fluorescente de la pantalla permite fijar uno o más trazos. Para ello se utilizó una cámara Tektronix (C-5C). El tiempo de apertura fue de 3.5 seg. Se utilizó rollo

3000 ASA (Polaroid 667) de revelado instantáneo.

La identificación electrofisiológica de las células registradas como pertenecientes a la población de la SNR se efectuó por su localización, frecuencia de disparo, forma del potencial (Grace et al, 1979). La verificación final se realizó histológicamente. El área de registro se marcó inyectando azul de Pontamina contenido en la pipeta de registro. Con este fin se pasó al final del experimento corriente negativa ( 0.1  $\mu$ A/30-60 min).

c).- Cirugía, materiales y equipo para realizar la estimulación de las eferentes nigrales.

La estimulación fue efectuada en el núcleo (ventro-medial) del tálamo (VMT) en una serie de experimentos, en otra serie en el colículo superior (CS) y finalmente en la formación reticular pontina (FRP) o sea en las eferentes de la SNR (Faulk y Mehler, 1978 ). El trépano se realizó para cada una de las estructuras en las siguientes coordenadas:

	Posterior	Lateral	Vertical
VMT	2.8	- 1.3	- 6.8
Colículo superior	7.3	- 1.0	- 3.1
FRP	7.7	- 1.0	- 6.1

Se tomó a la sutura bregma como punto de referencia para las mediciones del anteroposterior y el lateral y a la superficie de la corteza para la medición de la vertical. En un grupo piloto (n=10) se verificaron las coordenadas estereotáxicas.

Los electrodos de estimulación tuvieron las siguientes

características: bipolares trenzados de acero inoxidable recubierto con teflón (Wilbur D. Driver Co). Las puntas se separaron aproximadamente 1 mm. La impedancia de estos electrodos medida en un probador de resistencia DL-1000 Winston Electronic Co. fue de 30-60 Kohms. La impedancia también se midió "in situ" dando lecturas que oscilan en el mismo rango.

Para la estimulación se utilizó el siguiente equipo integrado al de registro previamente descrito (Figura 4): Cuando una espiga espontánea cruzaba el nivel de voltaje fijado en el procesador de espigas, el pulso cuadrado generado, se envió a un programador de pulsos (Digitimer D 100) para iniciar un ciclo de 1 seg de duración (1 Hz). El programador genera pulsos a tiempos definidos por el experimentador que sirven para activar otras piezas del equipo. Con el inicio del ciclo (tiempo cero) se disparó el barrido del osciloscopio y con un retardo variable (1-20 msec) se disparó el estimulador. El estimulador se conectó a su vez a una unidad de corriente constante (CCU, Grass CCU 1 A). La duración de los pulsos se ajustó en el estimulador a 0.2 msec, el voltaje se fijó en el valor necesario para lograr una salida máxima en la unidad de corriente constante de 1.5 mA. Esta unidad se conectó al electrodo bipolar colocado en el núcleo a estimular.

#### d).- Sustancias.

Se utilizó dinorfina 1-9 (Sigma) 50 pH, disuelta en solución salina normal (0.9 %) pH 7.0. En algunos experimentos (n=12) se administró tirosil-3,5-(H)-3H dinorfina 1-9 (Amersham),

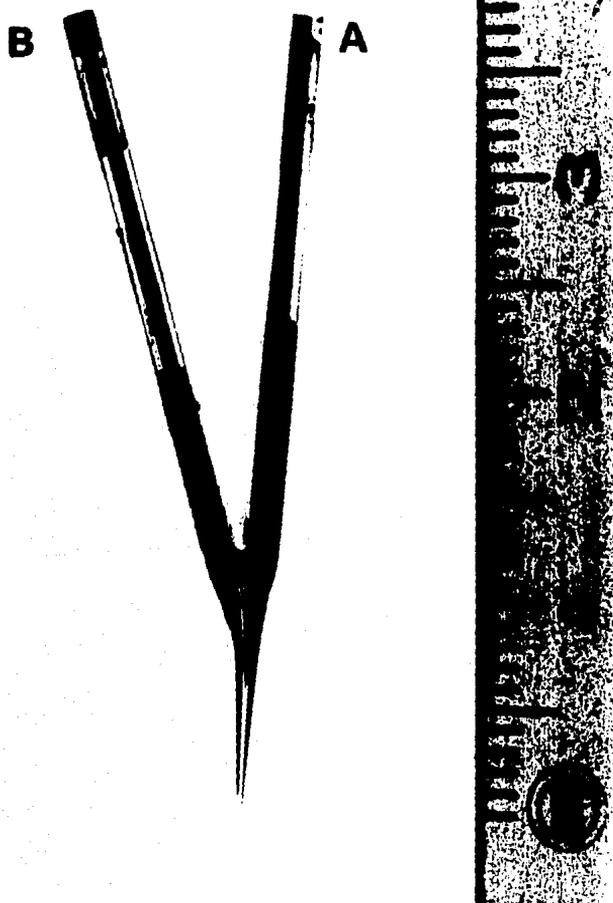


Figura 5.- Fotografía que muestra el arreglo del microelectrodo de vidrio (A) unido a la pipeta de inyección (B). La pipeta de inyección es obtenida en un jalador de pipetas David Kopf 700 C, luego se dobla en ángulo con calor y bajo un microscopio de luz se rompe la punta. Se une al microelectrodo bajo microscopio y se pega con una goma especial para vidrio (Loctite). Para evitar una separación en las puntas se deja secar en una cámara húmeda.

en concentración 50 nM, disuelta en solución salina normal, pH 7.0. Estos experimentos se realizaron con el objeto de confirmar la presencia de la dinorfina aplicada a través de la pipeta de inyección (ver sección g más adelante).

Como control se utilizó naloxona (donada por el Dr. Marion-Landais, DuPont) disuelta en solución salina normal pH 7.0, a una concentración de 2.0 mg/kg de peso, aplicada intraperitonealmente o de 0.2 mg/kg de peso, aplicada intravenosamente por medio de una cánula puesta en la vena femoral, o a una concentración de 0.02 mg/ml cuando se aplicó localmente por medio del sistema de doble barril.

#### e).- Procedimiento para el registro extracelular en la sustancia negra.

En una primera etapa del diseño experimental se localizaba una célula que por sus características de frecuencia de disparo, forma de la espiga y profundidad coincidiera con los criterios descritos en la literatura como perteneciente a la SHR. En un grupo control criterios similares pero particulares para el caso, ayudaron a la identificación de células en la SHC (Grace et al, 1979). Una vez localizada la célula se procedía a registrar la frecuencia de disparo basal de la neurona mediante el procesador de espigas y el graficador durante 3 minutos. Después se aplicaba la dinorfina y se anotaba el momento, la presión usada en el histograma de frecuencia. Se continuaba monitoreando la frecuencia de disparo de la célula con el péptido aplicado por lo menos 10 minutos más, según lo permitiera la sobrevivencia de la

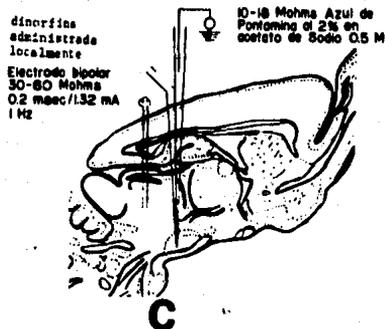
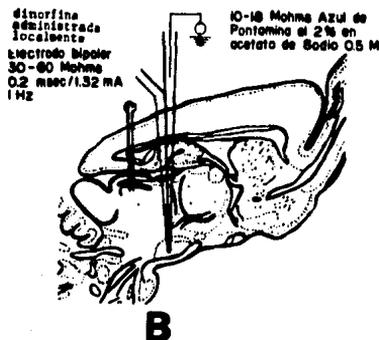
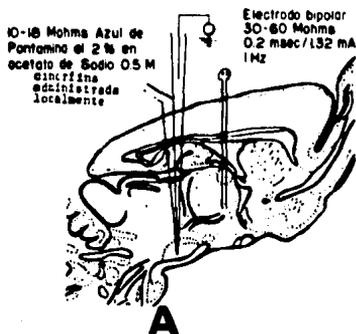


Figura 4.- Diagrama del diseño experimental. Se registró la actividad unitaria a nivel de la sustancia nigra reticulada con un macroelectrodo de vidrio. Se estimuló en una serie de experimentos en el núcleo ventromedial del tálamo (A) (n=7), en otra serie se estimuló el colículo superior (B) (n=7) y finalmente la formación reticular pontina (C) (n=7). La naturaleza antidrómica se verificó por la prueba de cheque. La frecuencia basal de disparo se registró durante 3 min y posteriormente se inyectó la dinorfina. Los registros después de la aplicación de la droga se continuaron por cuando menos 15 min.

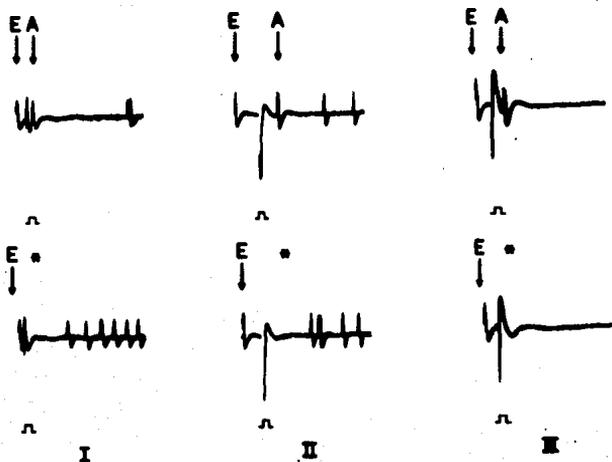


Figura 7.- Prueba de choque para cada estructura estimulada. E, espiga espontánea; A, potencial antidrómico; + ausencia de potencial antidrómico (prueba de colisión o choque). E barridos superpuestos.

célula.

En algunos experimentos además de graficar, se grabó la actividad celular para un análisis posterior.

### 1.- Inyección del fármaco.

Como ya se indicó antes, la pipeta de inyección estaba unido por la punta al electrodo de registro, mediante un pegamento especial para vidrio (Loctite). Esta pipeta tenía un diámetro en la punta de más de 10  $\mu$ m; estaba pegado a una distancia aproximada de 300-500  $\mu$ m de la punta del electrodo de registro (Figura 5). El electrodo de inyección se llenaba con el fármaco a probar y se conectaba mediante un tubo flexible de teflón a un aparato inyector por un lado, y por otro a una llave que proporciona aire comprimido (Picospritzer II, General Valve). Este aparato proporciona pulsos de inyección de duración variables y tiene un manómetro para poder regular la presión de la inyección. Se utilizaron pulsos de 50 msec de duración, con presiones que variaban entre 10-30 psi (libras/pulgada cuadrada). Antes de iniciar el experimento se probaba el sistema de inyección, se llenaba la pipeta con el fármaco, se conectaba todo el sistema de inyección y se aplicaba una presión de 5-20 psi; la aparición de una pequeña gota en la punta del electrodo, se observaba bajo el microscopio.

### 2.- Registro de células de SNR identificadas antidrónicamente.

#### Prueba de colisión o choque de potenciales.

Además del registro basal en la SNR aunado al efecto subsecuente de la dinorfina, se realizaron otros experimentos en los cuales el sitio de proyección de cada célula inyectada con

dinerfina fue previamente identificado (Figura 6). Una vez localizada una célula que cumplía los requisitos para ser considerada como perteneciente a la SNR, se procedía a la estimulación del núcleo eferente, que en una serie de experimentos (n=9) fue el núcleo ventro-medial del tálamo (VM), en otra serie (n=7) el colículo superior (CS) y finalmente la formación reticular pontina (FRP) (n=7).

Cuando se registraba un potencial producido por la estimulación en el núcleo eferente, se evaluó el carácter antidrómico del potencial, su latencia y su umbral. La naturaleza antidrómica de los potenciales provocados por la estimulación y registrados en la SNR se probó en cada caso mediante la prueba de colisión de potenciales (Wall, 1958). Esta prueba se basa en el principio de que la coincidencia en el tiempo y el espacio de un potencial que viaja en sentido antidrómico y otro espontáneo que viaja en sentido ortodrómico, produce la anulación de ambos potenciales si éstos viajan por la misma fibra o axón.

Para efectuar esta prueba se ajustó la ventana del procesador de espigas visualmente en el osciloscopio, de tal manera que una espiga espontánea que cruzara este nivel de voltaje disparase un pulso en el programador, con un retardo seleccionable. En el osciloscopio, se registró la espiga espontánea, seguida del artefacto de estimulación y la espiga antidrómica. El retardo inicial entre la espiga espontánea y el pulso de estimulación se fijaba a un valor aproximadamente 2 veces el de la latencia. El retardo era disminuido progresivamente hasta observar la anulación de la espiga

antidrómica.

Comprobada la naturaleza antidrómica del evento, se registraba la frecuencia basal de disparo por 3 minutos con la ayuda del procesador de espigas y el graficador, después se procedía a aplicar la dinorfina señalándose en el graficador el momento de la inyección y la presión usada. Se continuaba graficando la frecuencia de disparo de la célula por cuando menos 15 minutos más.

#### f).-Verificación histológica.

Al final de los experimentos se procedió a inyectar azul de pontamina a través del electrodo de registro, utilizando para este fin corriente negativa aproximadamente 0.1 uA durante 30-60 minutos. Posteriormente se sacrificó al animal mediante una sobredosis de anestesia. Se extrajo rápidamente el cerebro y se fijó sumergiéndolo en un vial que contenía formaldehído al 10 % y sacarosa al 1 %. Cuando menos una semana después se cortó en un crióstato (Damon IEC) en rebanadas de 30 um que se montaron en portaobjetos cubiertos con albúmina de huevo. Se permitió que se secaran los cortes en la albúmina utilizando una estufa bacteriológica a 60 grados centígrados. La tinción se realizó con violeta de cresilo utilizando la siguiente técnica: los cortes se hidrataron en agua destilada por 1 minuto, posteriormente se introdujeron en la solución de violeta de cresilo (0.16 %) durante 30 segundos aproximadamente, a continuación se deshidrataron gradualmente en alcohol etílico al 70, 95 y 100 %, se dejan aproximadamente 45 seg en cada solución.

Finalmente se aclararon con xilol, se montaron con resina sintética diluida en xilol. La verificación histológica se realiza en el microscopio de luz (Zeiss) utilizando el Atlas de König; Klipfel (1963).

En la serie de experimentos en los que se realizó estimulación antidrómica, el sitio de estimulación también se marcó pasando una corriente de 1.0 mA durante 6 seg (6 mCoulombs) a través del electrodo de estimulación. El sitio de registro se marcó igual que en los primeros experimentos y la técnica histológica fue la misma.

#### g).- Verificación de la presencia de la dinorfina.

Cuando se utilizó dinorfina marcada con tritio con el fin de verificar si la droga se estaba inyectando, el sitio de registro fue marcado igual que en las ocasiones anteriores y el animal fue sacrificado como se explicó previamente. El cerebro se extrajo rápidamente y se cortó con un bisturí en la región correspondiente a SNR. Se localizó el punto azul del colorante que indicaba la zona en que se efectuó el registro. Aproximadamente 1 mm alrededor de la zona de registro se cortó y se puso en un vial de centelleo que contenía 1 ml de NCS. Como control y siguiendo los mismos pasos, se extrajo un bloque del mismo tamaño, de la SNR contralateral al registro. Los viales se sometieron a 50-60 grados centígrados para permitir que el CMS disolviera el tejido y posteriormente se les agregó 10 ml de tritosol. Los viales se guardaron en la oscuridad por 18 horas, para disminuir la cantidad de luz absorbida durante la manipulación, antes de contarse en un contador de centelleo.

líquido. Para el total de cuentas se utilizó 1  $\mu$ l de la solución de dinorfina marcada en un vial de conteo junto con CNS y la misma cantidad utilizada de tritosol.

#### h).- Autorradiografía.

Para realizar la autorradiografía, se utilizaron portaobjetos de vidrio de 25 X 75 mm, perfectamente lavados y desengrasados, cubiertos con una capa de gelatina al 0.5 % diluida en agua destilada. A esta gelatina se le agregó un agente antimicótico (ácido de sodio 0.2%). Se permitió que los portaobjetos se secaran antes de adherirles los cortes.

En una primera etapa, ratas Wistar de 250-260 gr de peso, se sacrificaron con un exceso de anestesia, el cerebro se extrajo rápidamente y se pasó a un criostato en donde se realizaron cortes coronales (10-15  $\mu$ m) a nivel de la SHR. Los cortes se colocaron en los portaobjetos preparados para este fin y se pusieron a secar en una corriente de aire frío. Con el objeto de lavar del tejido péptidos endógenos, una vez secos los portaobjetos, se incubaron por 15 min a temperatura ambiente en un buffer tris-HCl 0.17 M que contenía 50  $\mu$ M de GTP y 100 mM de NaCl a pH 7.6. Los cortes se lavaron 2 veces más por 5 minutos en cada ocasión con buffer tris-HCl, pH 7.6 a temperatura ambiente. Los cortes lavados se incubaron en una solución de tirosil-3,5- (H)-3H-dinorfina (Amersham) 5 nM disuelta en buffer tris-HCl, durante 20 min a 20 grados centígrados. Una vez terminada la incubación, los cortes se lavaron dos veces con buffer tris-HCl a cero grados centígrados durante 5 min en cada ocasión. Después se pasaron por agua destilada y se secaron en

frio (2-4 grados centígrados) ya que el calor deshace la gelatina en la cual están montados los cortes. Para realizar los controles, a la solución que contenía a la dinorfina marcada, se le agregó naloxona a una concentración final de 10 mM. En esta nueva solución se incubaron los cortes. Otros controles se realizaron seleccionando algunas preparaciones de las incubadas tanto con dinorfina fría como con naloxona sola. Una vez secas, se pasaron a viales de centelleo con 1 ml de CHS (Amersham) para disolver el tejido, después se agregaron 10 ml de toluol, se almacenaron en la oscuridad por 24 horas y entonces se contaron en un contador de centelleo líquido (Beckman).

Una vez terminado el procedimiento de incubación ; lavado, los otros cortes una vez secos, se pasaron a un cuarto oscuro donde se cubrieron con la emulsión (Kodak NTB 3). Una vez realizada esta etapa, los portaobjetos se dejaron secar y se almacenaron en cajas oscuras y en frío durante 3-12 semanas. Concluido el tiempo de impresión, los cortes se revelaron (Dektol diluido 1:1 en agua) y se fijaron con (fijador Kodak). Posteriormente se observaron al microscopio de luz y fueron fotografiados. Algunos cortes adyacentes se tñieron con violeta de cresilo.

En una etapa posterior, con el fin de tratar de marcar sólo las células de la SHR que se estaban registrando y tratar de que la autorradiografía tuviera menos marca inespecífica, el experimento de registro se realizaba de la misma forma descrita anteriormente (b,c) pero en este caso, como se describió en la sección g, la pipeta contenía dinorfina tritiada. Una vez observado y cuantificado el efecto del fármaco inmediatamente se

procedía al sacrificio del animal con una sobredosis de anestesia y el cerebro se extraía rápidamente, se pasaba a un criostato y se obtenían cortes coronales de 30  $\mu$ m. El tratamiento de los cortes se realizó como se acaba de describir para la autorradiografía. Los cortes se dejaron almacenados para la impresión de la marca radiactiva en la emulsión. En esta ocasión ya que la marca es muy poca se almacenaron durante 6 meses. Se revelaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

#### ii).- Estadística.

Se realizaron pruebas de t de Student para grupos relacionados, comparando la media de los cien datos de los tres minutos de registro basal contra la media de cien datos después de la aplicación de dinorfina. Esto se realizó con la ayuda del programa estadístico Sistema Interactivo de Análisis Bioestadístico (SIAB) para la computadora PDP-11 del Instituto de Fisiología Celular.

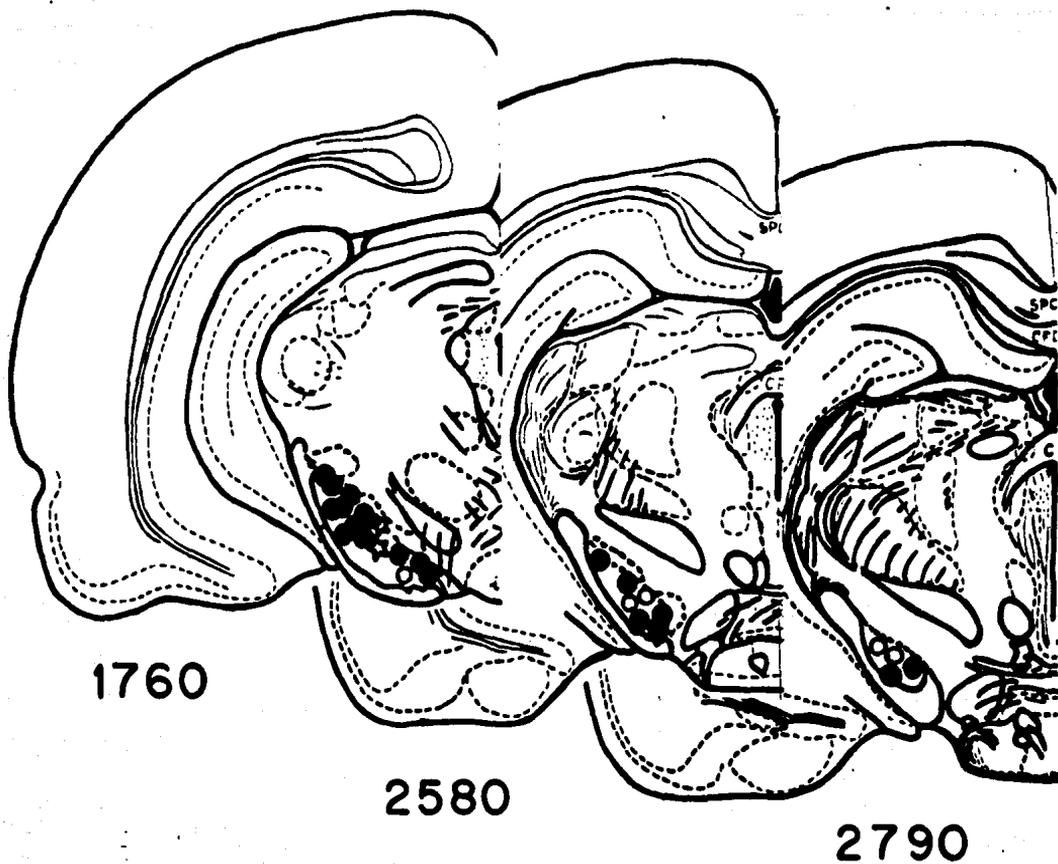


Figura 8.- Diagramas tomados del Atlas de König y Klippel en donde se muestran en diferentes planos los sitios de registro de las células en SNr. Los círculos negros muestran el sitio de registro y aplicación de la dinorfina. Las estrellas muestran el sitio de radioactividad, y los círculos blancos muestran el sitio en donde se registraron células que no modificaron su patrón de disparo después de la aplicación de la dinorfina.

## C).- RESULTADOS.

### a) Efecto de la dinorfina en la sustancia negra reticulada.

Siguiendo los criterios descritos en la literatura, se registraron 30 células como pertenecientes a la SNR cuya localización fue verificada histológicamente (Figura 8).

Se registró la frecuencia basal de disparo de las células durante 3 min. Después se procedió a aplicar la dinorfina. 21 de las células registradas (70%) mostraron una disminución en la frecuencia de disparo. En promedio la disminución fue de  $53 \pm 14\%$  con respecto al nivel basal de disparo para cada célula (100%).

En algunos casos no se observó ningún signo de recuperación de la frecuencia basal aún cuando se registró por tiempos tan largos como una hora. En otras ocasiones las células mostraron una brusca disminución en la frecuencia de disparo y después una pequeña recuperación sin llegar nunca a su nivel basal original.

El 30% restante de la neuronas muestreadas no presentó cambios en su frecuencia de disparo (Figura 9).

La latencia desde el momento de la inyección hasta el momento del efecto máximo en este caso fue de 0.7-4.1 min ( $\bar{X} \pm 2.04 \pm 1.1$  min).

### b) Efecto de la dinorfina marcada radiactivamente administrada en sustancia negra reticulada.

Con el objeto de probar si las células que no respondían a la aplicación del péptido estaban recibiendo la droga, o si la pipeta se había ocluido en el trayecto, quizá con el mismo tejido, se procedió a aplicar dinorfina marcada con tritio. En

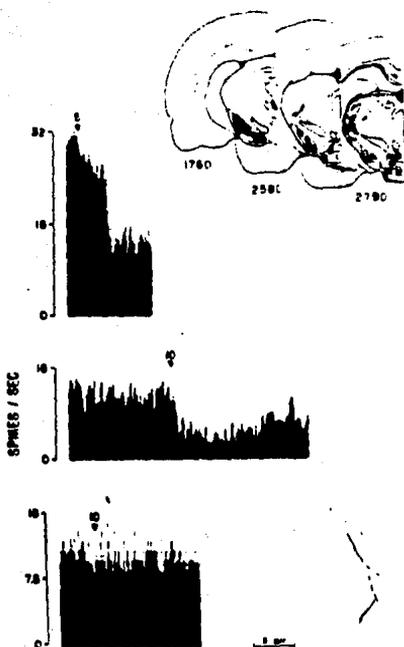


Figura 9.- Histogramas de frecuencia de las células registradas en SNR. Se registró 3 min el nivel basal de disparo y después (triángulo) se administro la dinorfina. El eje de las abscisas indica la frecuencia de disparo de la célula por segundo. El eje de las ordenadas el tiempo. Se anexan diagramas de los planes del Atlas de König y Klippel que indican los sitios de registro.

este grupo, se registraron 10 células a las cuales se les administró la dinorfina marcada, se cuantificó su efecto y luego se verificó la presencia de la marca. En 8 de las neuronas registradas se encontró radioactividad ( $486 \pm 564$  cpm arriba del blanco) o sea que la pipeta inyectó dinorfina en 83 % de los casos. De estas células donde se observó radioactividad 6 se inhibieron y 2 no modificaron su patrón de disparo. Por lo tanto se puede pensar que algunas de las células que no responden si recibieron la droga, pero no modifican su frecuencia de disparo.

c) Efecto de la dinorfina administrada en la sustancia negra compacta.

Con el objeto de aclarar si el efecto de la dinorfina es específico para las células de SNR, o si en otro tipo de células ocurría también una disminución en la frecuencia de disparo, se decidió probar la acción del péptido en la SNC. Utilizando el mismo diseño experimental se registraron 10 células en este núcleo. Se utilizaron los criterios reportados para su identificación y se corroboró el sitio de registro con la histología posterior (Figura 10). 8 células no modificaron su patrón de disparo cuando el péptido se aplicó aún cuando éste se inyectó en repetidas ocasiones. En 2 neuronas aumento la frecuencia de disparo (55%) con una latencia de  $1.57 \pm 1.32$  min. (Figura 10).

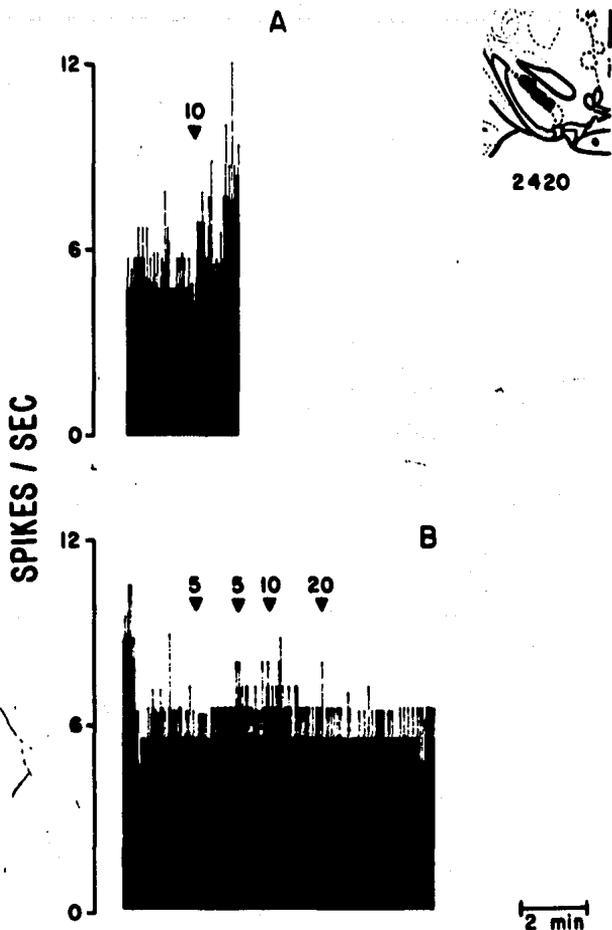


Figura 10.- Histogramas de frecuencia de células registradas en SNC. 8 células no muestran modificación en su frecuencia de disparo (B) y 2 células muestran un aumento en su tasa de disparo (A). Como se puede apreciar en (B), a pesar de múltiples aplicaciones del péptido, no ocurrieron modificaciones. Se anexa el diagrama del plano del Atlas de König y Klippel que indica los sitios de registro.

d) Efecto de la dinorfina marcada administrada en la sustancia negra compacta.

Tratando de probar si la falta de respuesta en las células de la SNC era debida a que la dinorfina no se había inyectado, también se probó la presencia de la droga utilizando dinorfina marcada con tritio. Se realizaron 2 experimentos, en los 2 casos se encontró marca y correspondió a células que no modificaron su patrón de disparo.

e) Efecto de la naloxona sobre la respuesta producida por la administración de dinorfina en la sustancia negra reticulada.

Con el objeto de estudiar si el efecto de la dinorfina es farmacológico, se procedió a aplicar naloxona, un antagonista de receptores opiáceos (Pert y Snyder, 1976). El diseño experimental fue el siguiente: en un primer grupo (n=4) la naloxona se aplicó intraperitonealmente cuando los electrodos se encontraban 1 mm arriba de la SNR. Después se buscó una célula que reuniera las características descritas para neuronas de SNR y se le aplicó dinorfina. En estos casos el efecto del péptido fue de menor duración y amplitud y la célula recuperó su frecuencia basal de disparo (Figura 11).

En un segundo grupo (n=2), una vez que se encontró una célula, se procedió a registrar su frecuencia basal de disparo por 3 min y luego se le aplicó la dinorfina, se permitió que el péptido tuviera su efecto y entonces se aplicó la naloxona por vía intravenosa. En este caso, la disminución en la frecuencia de disparo producida por el péptido fue inmediatamente revertida, (Figura 11). Hay que hacer notar que la amplitud de la espiga del potencial de acción se redujo cuando se administró la naloxona

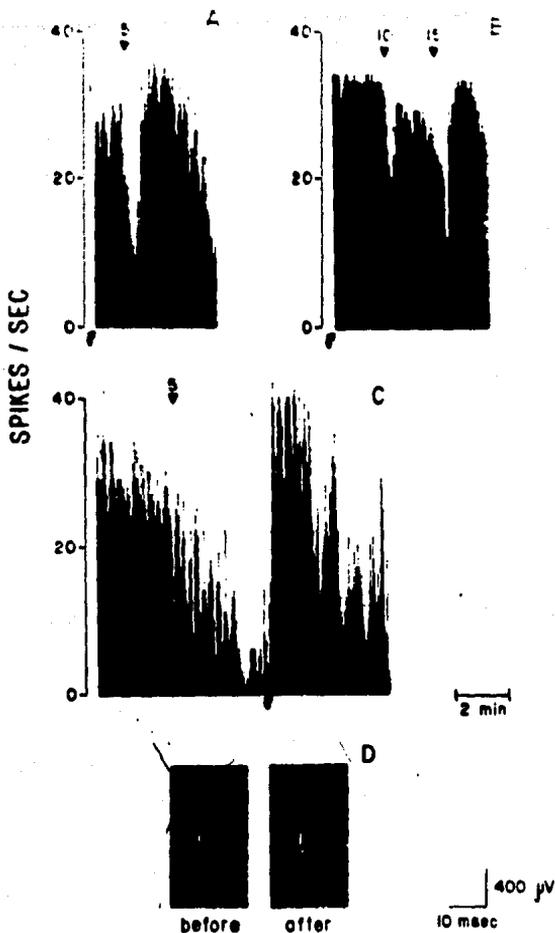


Figura 11.- En las figuras A y B se muestra el efecto de la aplicación de naloxona i.p. 0.2 mg/kg de peso 20 min antes del experimento. Como se indica con los triangulos, la aplicación de la dinorfina disminuyo la frecuencia de disparo, sin embargo el efecto fue de menor amplitud y de menor duración. En C primero se aplicó la dinorfina (triangulo) y se obtuvo un claro efecto en la frecuencia de disparo, después se aplicó la naloxona (flecha) 0.02 mg/kg de peso i.v. y el efecto se revirtió. En D se muestra la disminución en el tamaño de la espiga después de la aplicación de la naloxona.

por vía intravenosa (Figura 11 ); posiblemente el mismo efecto ocurrió con la administración i.p. pero como ésta se hizo previa al registro no se pudo observar.

En dos ocasiones, utilizando un sistema de tres electrodos, 2 de inyección y uno de registro, se inyectó naloxona localmente después de haber administrado dinorfina, en estas dos ocasiones también se revirtió inmediatamente el efecto inhibitor de la dinorfina.

f) Efecto de la administración del vehículo en la sustancia negra reticulada.

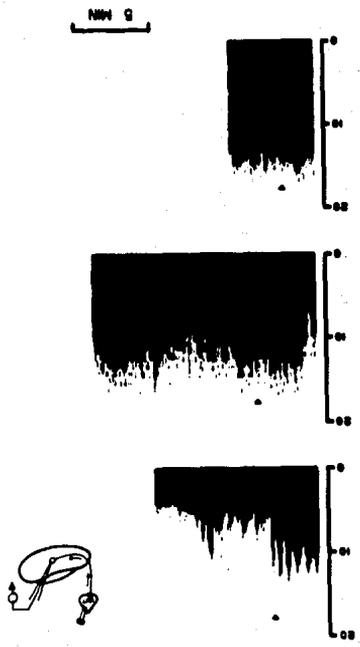
Se realizaron 3 experimentos en los cuales utilizando los electrodos de doble barril, se registró la frecuencia de disparo basal de células en SNR y después se administró solución salina normal (0.9 % NaCl) pH 7.0 a diferentes presiones (5-20 psi). Esto se realizó para probar si el efecto era debido a un artefacto mecánico. Se encontró que la frecuencia de disparo de las células muestreadas no mostró modificaciones, por lo que se puede pensar que los cambios obtenidos con la inyección de la droga no son un artefacto físico debido a la adición del líquido.

g) Efecto de la dinorfina en la SNR administrada a células de proyección talámica.

Se registraron 9 células como pertenecientes a las eferentes nigrales hacia VMT. Una vez que se probó la presencia de un potencial antidrómico (figura 12) y se realizó exitosamente la prueba de colisión, se tomaron las mediciones de latencia, corriente umbral y tiempo de choque. Se procedió entonces a

corresponde al 22.2%.

La población que no modifica su patrón de dispersión y que corresponde a un 41.4% de la población y la misma gráfica de dispersión que distingue en frecuencia de dispersión menos del 20% y aplicación del método. La gráfica de su medio representativa y la distribución normal en frecuencia de dispersión después de la aplicación de un método de ajuste gráfico de la población que normaliza idénticamente antitendientemente desde AMT. En la práctica se aplican los métodos de frecuencia que se aplican a



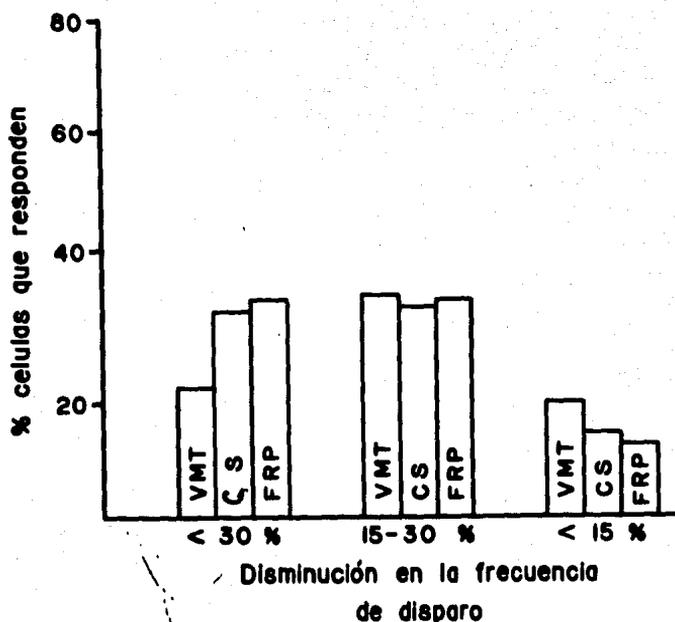


Tabla 1.- En esta tabla se resumen los resultados obtenidos. En el eje de las ordenadas se presenta el porcentaje de disminución obtenida cuando se administró la dinorfina. En el eje de las abscisas se indica el porcentaje de células que responden a la aplicación del péptido. Esto se grafica para cada grupo de células identificadas antídromicamente.

registrar el disparo basal de la célula y el efecto de la dinorfina. La latencia promedio fue de  $3.5 \pm 1.05$  ms. Este valor se tomó como el tiempo existente entre el inicio del artefacto de estimulación y el inicio del potencial antidrómico (ver abajo). La corriente umbral promedio fue de  $1380 \pm 620$  uA y se definió como la mínima corriente necesaria para producir un potencial antidrómico en el 100 % de los casos. El tiempo promedio de choque fue de  $2.5 \pm 0.6$  ms. Se consideró como tiempo de choque el retardo mínimo entre el potencial espontáneo y el inicio de la estimulación, que lleva a la desaparición del potencial antidrómico. La velocidad de conducción de las fibras, en promedio de 0.98 m/seg, fue calculada como se indica en la Figura 15. Hay que hacer notar que este valor es relativo ya que el axón no proyecta en línea recta.

Las células de proyección talámica mostraron una disminución promedio en la frecuencia de disparo de  $25.48 \pm 10.22$  % consideradas como un sólo grupo. Sin embargo la población se puede dividir en 3 grupos: 1) células que muestran una disminución en la frecuencia de disparo mayor al 30 % que en este caso es el 33.33 % de los casos 2/9 2) un segundo grupo que presenta una disminución entre 15-30 %; aquí se agrupa la mayoría de los casos (44.4 %) 4/9. 3) aquellas que no presentan cambios en la frecuencia de disparo 2/9 (22.2%) (Figura 12 y Tabla 1).

Hay que hacer notar que quizá esta sea una división arbitraria, obtenida mediante el procesamiento estadístico de los datos, y que en realidad se pudiera decir que sólo existen dos

poblaciones de células, las que muestran una clara disminución en la frecuencia de disparo como respuesta a la aplicación del péptido y otra población que no responde cuando se administra la dinorfina. Sin embargo, las gráficas y la estadística parecen señalar la presencia de un grupo que responde en menor medida al péptido (Figura 12). La latencia para notar el efecto máximo de la acción del péptido en aquellas células que responden al péptido es de  $1.88 \pm 1.66$  min.

#### h) Efecto de la dinorfina en SNR en células de proyección tectal.

Siguiendo el mismo diseño experimental que se utilizó para la estimulación en VMT y el registro en SNR, se procedió a estimular otro de los núcleos eferentes de la SNR, el colículo superior. Se registraron 7 células como pertenecientes a la vía nigro-tectal que en promedio presentaron una disminución en la frecuencia de disparo después de la aplicación del péptido de  $30.29 \pm 16.8$  % con respecto a la frecuencia basal. Como en el caso anterior la población se puede dividir en tres tipos, el 42.8 % de la población 3/7 presenta una clara disminución, la cual como en el caso anterior corresponde a células con una inhibición de más del 30% con respecto a su control basal; otro 42.8 % 3/7 una disminución media (15-30%) y un 14.2 % de las neuronas 1/7 no presentan una disminución apreciable (Figura 13 y Tabla 1). Hay que hacer notar que los promedios se tomaron como el punto en donde se presenta la máxima disminución después de la administración de la dinorfina.

Los potenciales antidrómicos tuvieron una latencia de  $4.52 \pm 2.51$  mseg, un tiempo de choque de  $4.83 \pm 1.33$  mseg y una

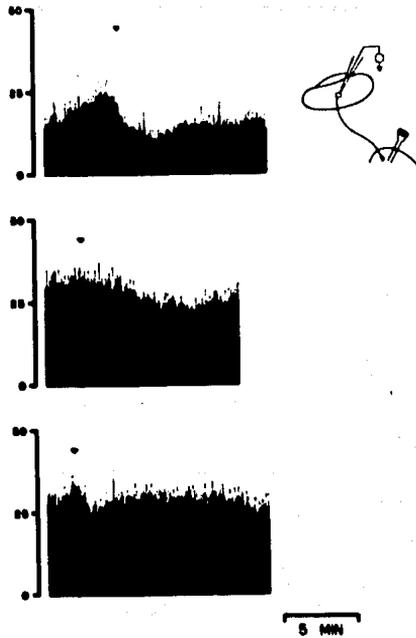


Figura 13.- Histogramas de frecuencia que muestran los resultados obtenidos con células identificadas antidrómicamente desde CS. Igual que en la figura anterior, se muestra en el primer histograma una célula que representa a las neuronas que tuvieron una disminución en su frecuencia de disparo de  $\pm$  del 30% y representa a 42.8%. En el siguiente histograma se muestra una neurona que pertenece al grupo de células que disminuyen poco su frecuencia de disparo basal, 42.8%, y por último un muestra de la población que no modifica su frecuencia de disparo (14.2%).

corriente umbral de  $730 \pm 320$  uA. Las fibras presentan una velocidad de conducción de 1.05 m/seg.

La latencia, tomada como el tiempo desde el inicio de la inyección, al momento del efecto máximo en estas células fue de  $3.2 + 1.77$  min.

i) Efecto de la dinorfina en SNR en células de proyección a formación reticular pontina (FRP).

Con los mismos criterios ya señalados, se procedió a la estimulación en el núcleo de la formación reticular pontina (FRP) otro blanco eferente de la SNR.

Se registraron 7 células que presentan una disminución promedio de  $35.47 \pm 13.88$  %. Los resultados también se pueden subdividir en tres tipos, el primer grupo corresponde a las células que presentan una disminución de más del 30% con respecto a su basal y que correspondió a un 42.86% de la muestra (3/7), otro grupo que presenta una disminución poco notable (entre 15 y 30% con respecto a su basal) y representa 28.57 % de la población (2/7) y un tercer grupo que no presenta cambios notables (con disminuciones de menos del 15% de su frecuencia basal) y equivale a 28.57% de la población 2/7 (Figura 14 y Tabla 1).

La latencia promedio fue de  $4.86 \pm 1.77$  mseg, el tiempo de choque de  $4.57 \pm 1.62$  mseg y la corriente umbral de  $390 \pm 90$  uA. La velocidad de conducción correspondió a 0.57 m/seg.

El tiempo que tomo el péptido en actuar desde el momento de la inyección hasta el momento de su máximo efecto fue de  $2.86 \pm 1.96$  min.

Hay que hacer notar que en todas las células del grupo A, o

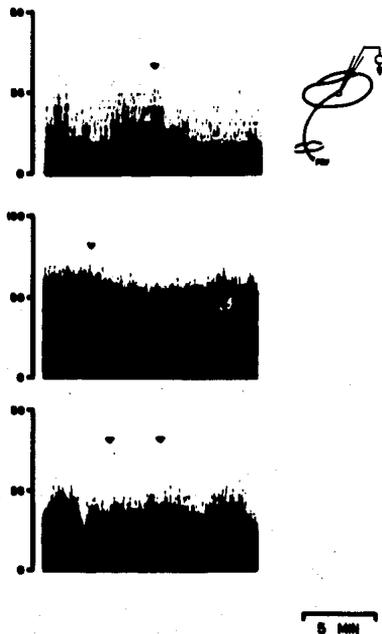


Figura 14.- Histogramas de frecuencia que muestran los resultados obtenidos con células identificadas antidrómicamente desde FRF. En la primera gráfica se observa una célula que representa a la población que responde a la administración del péptido con una disminución en la frecuencia de disparo de más del 30% con respecto a su basal, en la gráfica de en medio se muestra una células que disminuyo un poco su frecuencia de disparo basal (menos del 30%) y por último una neurona que no modifica su patrón de descarga.

sea aquellas que responden a la presencia del péptido disminuyendo su frecuencia de disparo en más del 30%, la tasa inicial de disparo nunca se recupero, aún cuando en algunos casos se registro hasta una hora. En las células del grupo B, que son aquellas que disminuyen su frecuencia de disparo entre 15-30% cuando se aplica la dinorfina, el retorno al nivel basal de disparo es variable, pues algunas incluso aunque se recuperan un poco no retornan totalmente al nivel inicial.

#### 1).- Autorradiografía.

Existieron diversos problemas para realizar la técnica. Aunque se obtuvieron algunos cortes y algunas fotos, éstas no son todo lo bueno que se quisiera, pues al parecer aunque existe más "fijación" en el área de la SNR, el "ruido de fondo" es bastante intenso en todo el corte en general. En otros cortes existió el problema del grosor y de la actividad específica, pues las preparaciones eran bastantes gruesas para la técnica (6-12  $\mu$ M) y la dinorfina utilizada tenía muy poca actividad específica por lo que al revelar la preparación, casi no se pudo apreciar el sitio de fijación, sin embargo se adjuntan algunas fotografías. Existe un analizador de marca para autorradiografía llamado Computer Assistant Densitometer, en el cual los cortes con ruido de fondo pueden ser analizados y se puede obtener una lectura de la marca fijada a un sitio particular habiendo restado toda la marca inespecífica. Sin embargo, en el caso particular de esta tesis, el aparato no estuvo a la disposición del proyecto. No se pudo continuar perfeccionando la técnica, pues la fábrica que marcaba el péptido (Amersham) dejó de producirlo, siendo la única compañía que fabricaba dinorfina marcada.



## DISCUSION.

De acuerdo con los resultados obtenidos, cuando la dinorfina se aplica localmente en células de SNR, un 40 % de las neuronas muestra una clara disminución en la frecuencia de disparo, presentando además la característica de que en los casos en que las células se registraron hasta una hora, nunca recuperaron su nivel basal de disparo. El 30 % restante se divide en aquellas células que presentan una pequeña disminución y las células que no modifican su frecuencia de disparo. En la prueba de inyección con dinorfina marcada, en un 83 % de los casos se encontró que la droga se inyectaba, esto nos permite afirmar que existen células que aún habiendo recibido el péptido no responden. Estos datos quedaron más claros al realizar los experimentos registrando las células que previamente se habían identificado antidrómicamente como pertenecientes a alguna de las eferentes de la SNR. Aquí también se observó la existencia de 3 poblaciones de neuronas, dependiendo de su respuesta al péptido, encontrándose una población que claramente disminuye su frecuencia de disparo con la dinorfina, perteneciendo quizá a las células con receptores kappa, una segunda población que presenta una respuesta de menor duración y amplitud siendo quizá células con receptores mu para los que la dinorfina tiene menos sensibilidad, y una tercera población que no modificó su frecuencia de disparo con la presencia de la dinorfina (Young et al, 1986) . Al aplicar naloxona, que es un antagonista de receptores

opiáceos, (Goldstein et al, 1979) se obtuvo en el 100% de los casos, una reversión clara del efecto del péptido, esto indica que la dinorfina aplicada está actuando en las células de SNR a nivel de receptores (Corbett et al, 1982).

Con los datos anteriormente citados es posible postular que el efecto de la dinorfina en las células de la SNR es farmacológico.

El método de inyección por presión de aire, permite la aplicación local de la sustancia a probar, sin alterar en general los parámetros eléctricos de la célula al ser inyectada la droga con corriente, como por ejemplo sucede con la iontoforésis, sin embargo, en algunas ocasiones la presión empleada empuja a la célula lejos del electrodo de registro o la daña, presentando también el problema de la obstrucción de la pipeta de inyección durante el trayecto hacia el sitio de registro. Parece importante discutir aquí la dosis de dinorfina empleada, al principio se decidió probar la inyección de 50 nM, cuando se noto que el efecto era de larga duración y amplitud, como un ensayo se redujo la concentración de dinorfina a 50 pM, como aún con esta pequeña concentración se continuaron notando los efectos del fármaco se decidió seguir el protocolo con esta dosis, sin embargo es evidente que la realización de una curva dosis-respuesta hubiera sido ideal.

1. Posibles efectos farmacológicos de la dinorfina y la naloxona.

Por otro lado, sobre los efectos de la dinorfina en la SNR es posible pensar que la disminución en la frecuencia de disparo de las células se pueda deber a una hiperpolarización de la membrana de estas neuronas. Esto es, que el péptido pudiera estar desplazando el potencial de reposo de la célula a niveles más negativos, produciendo así el que sólo con depolarizaciones mayores se pueda alcanzar el umbral de disparo del potencial. Se podría decir que la célula en estas condiciones es "menos excitable".

Existen datos de que los péptidos, en general hiperpolarizan a las neuronas (Nicoli et al, 1980), esto podría dar una indicación acerca de la razón de la disminución en la frecuencia de disparo de las células de la SNR con la dinorfina, aunque sería necesario realizar una investigación para poder aclarar el punto, pues durante los registros realizados para este trabajo no se midió el tamaño de la espiga antes y después de la aplicación del péptido, una indicación de la posible hiperpolarización de las células sería un aumento en el tamaño de la espiga después de aplicar la dinorfina. Ahora bien, existe además la observación de que la aplicación de naloxona disminuye el tamaño de la espiga, y aumenta la frecuencia de disparo, tanto en las células que previamente habían sido sometidas a la acción de la dinorfina como en neuronas controles, sin la presencia de ningún otro fármaco. Este resultado se ha reportado

previamente para células de dopamina (Hommer, et al, 1983) y se postula que estando las neuronas inhibidas tónicamente cuando se administra la naloxona se abole la inhibición, y subsecuentemente se reduce el tamaño de la espiga. Esto podría reforzar la idea de que las células son hiperpolarizadas por la dinorfina, aunque la manera de probarlo es realizando experimentos de registro intracelular.

## 2. El efecto de la dinorfina es prolongado.

Partiendo del hecho de que la dinorfina disminuye la frecuencia de disparo del 40% de las neuronas de SNR, llama la atención el largo tiempo que dura el efecto del péptido, y aunque se ha postulado que las proteasas degradan rápidamente a los péptidos, el efecto que se observó al realizar este trabajo experimental fue que la disminución en la frecuencia de disparo era de larga duración. Esto se puede aclarar con los experimentos realizados por Garzón et al (1984) en donde se incubó la fracción sinaptosomal P2 con naloxona tritiada por 30 min. y después se agregó dinorfina y se midió cada 5 minutos la naloxona fija remanente. Ellos encuentran que a los 30 min la IC50 de la dinorfina 1-13 es 20 nM. Aunque se ha descrito un rápido metabolismo del péptido "in vivo", la persistencia de la inhibición es muy grande. En el trabajo señalado arriba se hicieron estudios en los cuales la fracción P2 sinaptosomal se incubó con dinorfina marcada con tritio por 20 min, después las fracciones sinaptosomales

son lavadas y centrifugadas 6 veces en buffer y resuspendidas en un medio con un potente agonista marcado. Se encuentra que comparado con el pegado en el grupo control (110 fmol/mg pegado) las membranas sometidas a la dinorfina casi no permiten que se pegue agonista (5 fmol/mg pegado).

Para explicar el hecho de que la inhibición producida por la dinorfina sea de larga duración Garzón y su grupo proponen tres mecanismos: 1) la dinorfina se disocia muy lentamente de su receptor permaneciendo pegada y activa después de que el ligando libre es degradado, 2) la dinorfina induce cambios de larga duración en el receptor, que persisten después de la disociación y degradación del péptido y/o 3) la dinorfina libre permanece en altas concentraciones en el microambiente que rodea al receptor. Aunque aún no se puede distinguir entre estas posibilidades, la primera hipótesis parece ser la más consistente con la lenta velocidad de disociación del péptido establecida en experimentos realizados por este grupo. También parecería estar de acuerdo con el aparente efecto no-competitivo del péptido encontrado en los estudios de pegado (Garzón et al, 1984).

### 3. Receptores a la dinorfina.

Por qué existen algunas células que no responden?. Una posible explicación de este hecho podría deberse a la presencia en las células que responden de receptores kappa y a su ausencia en las que no responden. Young et al (1986)

realizando estudios de pegado, proponen que en tejidos ricos en receptores kappa la dinorfina se liga fuertemente, pues es su receptor natural, sin embargo en tejidos con baja cantidad de receptores kappa, como es el cerebro de rata, la dinorfina no solo se liga a su receptor específico sino que también se une con bastante afinidad a receptores de tipo mu. Esto también podría explicar porque algunas células responden de forma más evidente al péptido, serían aquellas que tienen el receptor kappa, las neuronas que tienen una respuesta de menor intensidad y duración serían aquellas que tienen receptores mu en donde también se estaría uniendo la dinorfina, y aquellas células sin respuesta no tendrían ningún tipo de receptores opiáceos. También es posible que estos receptores existan en dos estados de afinidad, una alta y otra baja, como se ha visto en el receptor D2 de dopamina (Creese, 1982) por lo que las células que muestran sólo una ligera disminución en la frecuencia de disparo podrían contener solamente receptores kappa en el estado de baja afinidad. Una posibilidad que hay que contemplar es que la concentración de dinorfina empleada en el trabajo de tesis sea más baja que la constante de afinidad del receptor por el péptido. Garzón et al (1983) reportan que la IC 50 del péptido es 20 nM, por lo que casi se podría descartar la posibilidad de una interacción inespecífica o débil sin embargo hubo casos en los cuales la dinorfina se administró repetidamente (Figura 16) teniéndose por lo tanto un efecto de suma en la concentración de dinorfina aplicada a una

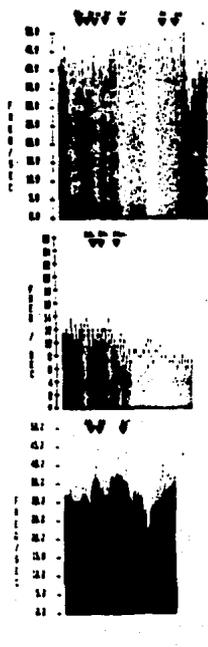


Figura 16.- Histogramas de frecuencia de células registradas en la SNR, que fueron sometidas a varias aplicaciones de la dinorfina. Como se puede observar, algunas reponen claramente al péptido (B), sin embargo otras parecen no modificar su frecuencia de descarga (A). Los triángulos indican el momento de la inyección y la presión usada en libras/pulgada cuadrada.

célula. En varios casos las neuronas que recibieron repetidas aplicaciones del péptido no respondieron con cambios visibles en la frecuencia de disparo, pero en algunos casos sí disminuyeron su tasa de disparo, en estas células el fenómeno se podría explicar por el concurso de receptores diferentes a los kappa, quizá receptores mu, que como ya se dijo antes tendrían menor sensibilidad por la dinorfina y por lo tanto se necesitaría una mayor cantidad del péptido para tener un efecto. por último las células que no muestran ningún efecto con la administración de dinorfina podrían no tener receptores para ningún tipo de opiáceos.

Hay que destacar que dentro de la sustancia negra, el efecto de la dinorfina parece ser específico para la zona reticulada, ya que cuando el péptido se aplicó en la zona compacta, en 8 casos no hubo modificación al patrón de disparo de las células, y en 2 casos hubo aumento de la frecuencia de disparo, quizá debido a que el péptido produjo un efecto neto de excitación al inhibir a las células que estaban inhibiendo a las neuronas de la zona compacta. El caso en el aumento en la frecuencia de disparo nunca sucedió en la SNR. Esto parece más claro si pensamos que es a la zona reticulada a donde llega la inervación estriatal que contiene dinorfina (Vincent et al, 1982).

#### 4. Dinorfina, un modulador o un neurotransmisor?.

Un punto importante cuando se habla de péptidos dentro del sistema nervioso central es la discusión acerca del papel que juegan, ya como neurotransmisores en el sentido clásico

de la palabra, ya como moduladores. En general se puede decir que una de las diferencias entre péptidos y transmisores es que el efecto de los péptidos es de larga duración (minutos) comparado con los transmisores, (Lundberg y Hokfelt, 1983). En un trabajo de Barker et al (1978) en que se prueba la modulación que ejercen las encefalinas sobre la transmisión de glutamato y glicina en neuronas en cultivo de la médula espinal, se propone una interesante diferencia entre transmisores y moduladores. Se dice que los neurotransmisores están involucrados en una activación breve de una conductancia a iones específicos acoplada a un receptor que es independiente del voltaje. Esta conductancia cambia momentáneamente la excitabilidad de la membrana. La aplicación sostenida del transmisor lleva a una rápida inactivación de la conductancia acoplada al receptor a través de un fenómeno conocido como desensibilización. En cambio la interacción de los péptidos con la membrana postsináptica puede ser atribuida a un efecto neurohormonal de los péptidos. Esta forma de comunicación involucra una regulación de larga duración de la conductancia dependiente e independiente de voltaje en células específicas por los péptidos liberados .

##### 5. Coliberación con GABA.

Es importante señalar que la mayor parte de los neurotransmisores que coexisten o se coliberan lo hacen con

péptidos. Por ejemplo en el tálamo del gato el GABA y la somatostatina coexisten o también coexisten CCK y dopamina en el área ventral tegmental de la rata (Lundberg y Hoekfelt, 1983).

Con estos antecedentes es posible suponer un papel modulador de la dinorfina en el sistema estriado-nigral, quizá modificando el efecto del GABA. Es necesario hacer notar que aunque los somas GABAérgicos y dinorfinérgicos del estriado no parecen ser los mismos, pues la vía de GABA procede del estriado caudal y parece ser que la de dinorfina de la parte anterior del estriado (Vincent et al, 1982) tanto el aminoácido como el péptido se comportan como inhibidores, siendo la inhibición producida por la dinorfina de larga duración. Sería un problema interesante el tratar de aclarar, si el GABA y la dinorfina se liberan por la misma vía y en células comunes, de esta manera la dinorfina podría acentuar o prolongar la acción inhibitoria del GABA.

Con respecto a la posible interacción de la dinorfina con el GABA vale la pena mencionar el trabajo de Garant y Gale (1986) en el cual encuentran que la neurotransmisión mediada por GABA en la SN puede ejercer una acción anticonvulsiva; cuando administran bicuculina intravenosa en ratas observan que la infusión de muscimol en la SN reduce significativamente las convulsiones. Este y otros experimentos confirman hallazgos anteriores del mismo grupo en los cuales la inhibición de neuronas de la SN puede abolir las convulsiones inducidas por la bicuculina. Se sabe que

cuando se aplican agonistas de GABA a la SN se inhiben las neuronas y las eferentes del núcleo (Olianas et al, 1978). De acuerdo con estos datos parece ser que la facilitación ejercida por la SN en las convulsiones afecta más la propagación de éstas que la iniciación de las mismas, esto se desprende de los resultados obtenidos cuando al aplicar estímulos convulsivantes restringidos a la SN, éstos no provocan convulsiones mientras que cuando se aplica muscimol intranigralmente no cambia la latencia de los síntomas iniciales de la actividad epiléptica. Todo esto parecería indicar que las eferentes nigrales ejercen su influencia en el mantenimiento o en la propagación de la actividad epiléptica generada en el cerebro. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis, y el hecho de que las células que reponen a la dinorfina forman parte de las eferentes de la SNR, podría pensarse que el péptido pudiera actuar como anticonvulsivante con la ventaja de tener una acción prolongada. En un artículo anterior (1985) de los mismos autores, señalan que la infusión intranigral de dinorfina 1-17 la cual se une fuertemente a receptores kappa no proporciona protección contra las convulsiones producidas por electroshock, sin embargo la infusión de dinorfina 1-13 que es menos selectiva para los receptores kappa, y que es degradada a metabolitos como la Leu-encefalina, sí tiene acción protectora contra las convulsiones, pues sus metabolitos tienen alta afinidad por los receptores mu, que serían los directamente involucrados en la protección contra las convulsiones.

Aquí es conveniente mencionar que existe una considerable evidencia farmacológica del papel que desempeñan los péptidos opioides en el control de la ingesta de comida y agua . Se ha mostrado que las drogas que actúan como agonistas a los receptores kappa producen hiperfagia (Jackson et al, 1985, 1986) Gosnell et al (1986) administraron intracerebroventricularmente dinorfina 1-17, D-ala MePhe Gly-ol encefalina y D-ser, leu encefalina, péptidos que se postulan como agonistas de receptores kappa. mu y delta respectivamente. Los tres péptidos estimularon la ingesta de comida, pero la dinorfina estimuló este comportamiento a dosis más bajas que los otros péptidos y la magnitud del efecto fue mucho mayor (Gosnell et al, 1986).

Resulta interesante discutir los trabajos de Przewlocka et al y Przewlocki et al (1983) quienes reportan que la dinorfina muestra una significativa acción anticonvulsivante en contraste con otros péptidos, además la inmunoreactividad a la dinorfina aumenta cuando se producen estimulaciones subumbrales repetidas en la amígdala del conejo . La administración de dinorfina protege al animal de convulsiones clónicas, siendo éste efecto antagonizado por la naloxona.

En este mismo contexto son relevantes las observaciones de Herrera-Marchitz et al (1984) quienes dado el paralelismo existente entre GABA y dinorfina en la vía estriado-nigral y de la posible co-localización de las dos sustancias, comparan los efectos obtenidos con la inyección intranigral de GABA o

de dinorfina. El GABA induce una rotación contralateral muy intensa pero de corta duración mientras que el efecto de la dinorfina es de una hora. Esto podría atribuirse a un fenómeno de cooperación entre un neurotransmisor clásico y un péptido, semejante al observado en el sistema periférico por Lundberg y Hoefelt (1983).

Por otro lado, Faden y Jacobs (1983) encuentran que la infusión intratecal de dinorfina 1-17 provoca parálisis flácida de los miembros superiores, relacionada con la dosis del péptido administrado. Esta parálisis se presenta entre los 4-8 min de la infusión de la dinorfina y es completa y espontáneamente reversible. Sin embargo el efecto se prolongó hasta por 2 días. Tal vez la dinorfina intratecal esté influyendo en las eferentes de la SN, en este caso en la salida del colículo superior, que según reportes de Deniau et al (1978b) puede estar relacionado directamente con motoneuronas. Se ha encontrado alta inmunoreactividad a la dinorfina en las porciones ventral y dorsal de la médula espinal (Zamir et al, 1983). La aplicación de la dinorfina A intratecalmente produce efectos antinociceptivos dependientes de la dosis cuando los animales son sometidos a pruebas conductuales como el retiro de la cola al aplicar calor y la flexión de la cola al aplicar presión (Herman et al, 1984).

#### 6. Interacción con dopamina.

Aquí es importante comentar los trabajos de Walker et al, (1987) quienes encuentran que la morfina incrementa los

niveles estriatales de DOPAC mientras que un agonista específico para receptores kappa el U50,488 causa una disminución en la liberación de dopamina en el caudado, sugiriendo una disminución en la actividad de la dopamina. Los resultados de este trabajo son consistentes con la posibilidad de que los opiáceos modifiquen el comportamiento motor, al menos en parte, por su acción en células de dopamina de la SN. Hommer y Pert (1983) encontraron que la morfina administrada por iontoforesis inhibe una clase especial de neuronas de la SNR que pueden ser células inhibitoras. Los autores especulan con el hecho de que péptidos parecidos a la dinorfina puedan ejercer su acción en el caudado a través de receptores kappa en este núcleo, en donde se ha encontrado gran cantidad de este tipo de receptores, con la sustancia P actuando principalmente postsinápticamente.

#### 7. Interacción con la sustancia P.

Al mencionar a la sustancia P es importante comentar el trabajo de Collingridge y Davies (1982) en el cual se aplica sustancia P, sulfato de morfina, Met-enkefalina y GABA mediante iontoforesis en la SNC y SNR y se registra la actividad extracelular. La aplicación de sustancia P o morfina en neuronas de SNC no modifica el patrón de disparo aunque excita sin embargo al 50% de las células muestreadas en SNR. La Met-enkefalina no provocó cambios cuando se aplicó en SNC e inhibió al 50% de la población muestreada en

SNR. Para explicar la activación del sistema nigro-estriatal observada cuando se administra local o sistémicamente morfina o sustancia P se podría proponer que la acción de estas drogas puede ser mediada indirectamente, posiblemente en SNR, en donde la sustancia P y la dinorfina podrían estar actuando sobre un mismo tipo de neuronas. Tal vez la dinorfina podría estar regulando el efecto de la sustancia P o a la inversa.

En este contexto hay que citar nuevamente a Herrera-Marchitz et al (1984) quienes discuten la posibilidad de que la estimulación del metabolismo y la liberación de dopamina por el GABA sea mediado por neuronas inhibitoras tal vez de dinorfina en la SNR como propusieron Grace y Bunney (1979).

Sobre la posible interacción de dinorfina y sustancia P es muy importante discutir el estudio de Nylander y Terenius (1986) en el cual se administró crónicamente durante 10 días dosis de haloperidol a un grupo de ratas y de clozapina a otro grupo, las dos son drogas neurolepticas. Encuentran que en la sustancia nigra, no ocurre ningún cambio significativo en los niveles de dinorfina con el tratamiento de haloperidol, sin embargo los niveles de sustancia P están disminuidos. En el grupo que recibió el tratamiento de clozapina, los niveles tanto de la dinorfina como la sustancia P están elevados. En el estriado el tratamiento con haloperidol disminuye el nivel de dinorfina ligeramente, y no afecta a la sustancia P, la clozapina no modifica el nivel de dinorfina, pero incrementa el nivel de sustancia P.

De sus estudios en el globo pálido y el hipocampo se puede concluir que el efecto más prominente de los neurolepticos es en el estriado y la sustancia nigra. Sin embargo se puede apreciar que los dos sistemas de péptidos (dinorfina y sustancia P) están afectados diferencialmente después de interferir con el sistema dopaminérgico. Al parecer el haloperidol sólo disminuye los niveles de sustancia P en la SN, sin afectar los niveles en el estriado, indicando que el bloqueo de los receptores de dopamina incrementa la actividad de las neuronas de sustancia P causando la depleción del péptido en la terminal. Los niveles de dinorfina en el estriado y en la SN no fueron afectados.

La clozapina tuvo un efecto diferente al haloperidol, la diferencia de la acción de la clozapina puede radicar según los autores en la alta actividad anticolinérgica de la clozapina comparada con el haloperidol o en diferente sensibilidad del receptor. Esto hace interesante la relación entre dinorfina y clozapina, pues la clozapina es un neuroleptico no cataleptogénico y clínicamente produce pocos o ningún efecto colateral extrapiramidal comparado con el haloperidol, por lo que la influencia divergente de la droga en el sistema de péptidos de los ganglios basales es de gran interes. La dinorfina una vez más puede estar jugando un papel de gran importancia en la regulación de los efectos motores colaterales en el tratamiento clínico con neurolepticos, pues de acuerdo a los resultados presentados en este tesis la dinorfina parece que disminuye la

excitabilidad de las neuronas de la SNR, por lo que este sería otro punto a tomarse en cuenta en futuros análisis de las drogas usadas clínicamente en el tratamiento de síndromes motores.

Un problema importante que deberá tratar de resolverse es el definir la interacción de la dinorfina con la sustancia P, o aún más complejo, una interacción entre sustancia P, GABA y dinorfina. Una forma de tratar de dilucidar si la dinorfina es un modulador o un transmisor quizá sea probando el efecto de la dinorfina, habiendo bloqueado los transmisores GABA y sustancia P con antagonistas específicos. Esto sólo se podría llevar a cabo utilizando rebanadas, a las cuales en el baño de perfusión se les puede agregar tanto los antagonistas, como los péptidos. En estas condiciones podría registrarse en una célula de SNR el efecto de la dinorfina, y agregar al baño GABA y dinorfina para ver si hay efectos sumatorios y prolongados y comparar posteriormente con el efecto obtenido con la dinorfina sola. Lo mismo se podría hacer con la sustancia P. Probablemente de esta manera se podría dilucidar si la dinorfina está teniendo un efecto de potenciación, respecto al efecto normal del GABA o tiene un efecto totalmente distinto.

También sería importante tratar de aclarar la posible regulación ejercida por otros neurotransmisores sobre la transmisión de dinorfina. Por ejemplo, Li et al, (1986) proponen que la dopamina mediante la vía nigro-estriatal

ejerce una regulación sobre el metabolismo del péptido. La inyección de apomorfina incrementa de una manera dependiente de la dosis, la inmunoreactividad al péptido en el estriado y la sustancia nigra. Tal vez también podría existir una regulación de las neuronas colinérgicas interestriales sobre las células de dinorfina.

Herrerera-Marchitz et al (1984) llevaron a cabo estudios farmacológico-conductuales, inyectando el péptido estereotáxicamente en la SNR. Observaron que la aplicación de dinorfina produce giro contralateral dependiendo de la dosis. Sin embargo, cuando el agente liberador de dopamina, D-anfetamina, es inyectado subcutáneamente 1 hora después de la dinorfina, tiempo en el cual la rotación ha disminuido notablemente, se produce un marcado aumento en la rotación contralateral, sugiriendo que el péptido directa o indirectamente activa neuronas de dopamina en el lado de la inyección. Con la misma idea, el trabajo realizado por el grupo de Quirion en 1985, observa que el tratamiento crónico con haloperidol incrementa marcadamente el contenido de la dinorfina y de Leu-encefalina en el estriado y en la SN. En ese trabajo se postula que el sistema dinorfinérgico estriado-nigral está bajo modulación dopaminérgica. Estos datos se vuelven aún más interesantes si tomamos en cuenta que durante la enfermedad de Parkinson, el control dopaminérgico del estriado esta disminuido, siendo probable que la liberación de dinorfina en la SNR estuviera modificada.

Antes de terminar esta discusión, sería muy interesante

plantear algunos experimentos que no se realizaron en su momento, pero que seguramente serán incluidos en la continuación de este trabajo. Uno de ellos consistiría en tratar crónicamente a los animales con antagonistas a GABA y después realizar los experimentos de registro en SNR y aplicación de dinorfina, para tratar de ver si el efecto del péptido es igual al obtenido en condiciones control. Otro experimento sin duda muy importante sería estimular los núcleos aferentes a la SNR y registrar y aplicar dinorfina en SNR para estudiar el efecto transináptico, lo cual evidentemente sería de gran utilidad.

Como se puede apreciar, el campo de investigación de los péptidos dentro del sistema nervioso central es muy interesante, y dentro del circuito de los ganglios basales es todavía poco lo que se sabe acerca del papel de los opioides. Por lo tanto se hace necesario profundizar en el tema y definir el papel que juegan los opioides en este sistema. De alguna manera este trabajo de tesis ha tratado de aclarar la función de un opioide endógeno como lo es la dinorfina, en el funcionamiento correcto de los ganglios basales. Este trabajo trata de hacer más exacta la visión de los mecanismos involucrados en el control del movimiento y afinar los métodos hasta ahora aplicados para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con alteraciones en el sistema de los ganglios basales.

## CONCLUSION.

Basándose en los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se concluye que :

1).- La dinorfina disminuye la frecuencia de disparo del 70 % de la neuronas de la sustancia nigra reticulada estudiadas y no produce respuesta en el 30% restante.

2).- Con estos resultados se propone la existencia en la SNR de: una población que muestra un fuerte decremento en la frecuencia de disparo, otra que presenta una pequeña disminución en esta y un tercer grupo que no presenta cambios.

3).- El efecto de la dinorfina parece ser farmacológico porque en todos los casos fue reversible por la aplicación de naloxona.

4).- El efecto de la dinorfina es específico para las células de la pars reticulata de la SNR.

Se discuten los mecanismos que estarían involucrados en las diferentes respuestas al péptido y se proponen algunos abordajes experimentales para tratar de aclarar el papel de la dinorfina como transmisor o modulador dentro de la vía estriado-nigral.

## BIBLIOGRAFIA.

- Andén, N. E., Carlsson, A., Dahlstrom, A., Fuxe, K., Hillarp, N. A. and Larsson, K., 1964. Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci.* 3: 523-530.
- Andén, N. E., Dahlstrom, A., Fuxe, K. and Larsson, K., 1965. Further evidence for the presence of nigro-neostriatal dopamine neurons in the rat. *Amer. J. Anat.* 116: 329-333.
- Anderson, M. E. and Yoshida, M., 1977. Electrophysiological evidence for branching nigral projection to the thalamus and the superior colliculus. *Brain Res.*, 137: 361-364.
- Arbuthnott, G. W., Walker, R. H., Whale, D. and Wright A. K., 1982. Further evidence for a pallido-striatal pathway in rat brain. *Physiol. Soc. Abstr.* 33
- Azmitia, E. C. and Segal, M., 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179: 641-668.
- Baker, J. L., Smith, T. G. and Neale, J. H. 1978. Multiple membrane actions of enkephalin revealed using cultured spinal neurons. *Brain Res.* 154: 153-158.
- Bentivoglio, H., Van der Kooy, D. and Kuypers, H. G., 1979. The organization of the efferent projection of the substantia nigra of the rat. A retrograde fluorescent double labeling study. *Brain Res.* 174: 1-17.
- Bobillier, P., Sequin, S., Petitjean, F., Salvart, D., Touret, M. and Jouvet, M., 1976. The raphe nuclei of the cat brain stem: a topographical atlas of their efferent projections as revealed by autoradiography. *Brain Res.* 113: 449-486.
- Brodal, A., 1982. *Neurological Anatomy.* 4th Ed. Oxford University Press, New York.

- Brookes, A. and Bradley, P. B., 1984. Electrophysiological evidence for kappa-agonist activity of dynorphin in rat brain. *Neuropharmacol.* Vol. 23, No. 2A: 207-210.
- Bunney, B. S. and Aghajanian, G. K., 1976. The precise localization of nigral afferents in the rat determined by a retrograde tracing technique. *Brain Res.* 117: 423-436.
- Cajal, R. 1911. Tomado de Graybiel, A.M. and Radgsdale, C.W., Fiber connections of the basal ganglia. *Prog. Brain Res.* 51: 525-562.
- Carman, J. B., Cowan, W. H. and Powell, T. P., 1963. The organization of cortico-striate connections in the rabbit. *Brain Res.* 86: 525-562.
- Carman, J. B., Cowan W. H., Powell, T. P. and Webster, K. E. 1965. A bilateral cortico-striate projection. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 28: 71-77.
- Carpenter, M.B., Nakano, K. and Kim, R., 1976. Nigrothalamic projection in the monkey demonstrated by autoradiographic techniques. *J. Comp. Neurol.* 165:401-416.
- Carpenter, M. B. and Strominger, N. L., 1976. Efferent fibers of the subthalamic nucleus in the monkey. A comparison of the efferent projections of the subthalamic nucleus, substantia nigra and globus pallidus. *Amer. J. Anat.* 121: 41-72.
- Carpenter, M. B., Batton, R. R., Carleton S. C. and Keller, J. T., 1981. Interconnections and organization of pallidal and subthalamic nucleus neurons in the monkey. *J. Comp. Neurol.* 197: 579-603.
- Collingridge, G. L. and Davies, J. 1982. Actions of substance P and opiates in the rat substantia nigra. *Neuropharmac.* 21: 715-719.
- Cone, R. I., Weber, E., Barchas, J. D. and Goldstein A., 1983. Regional distribution of dynorphin and neo-endorphin peptides in rat brain, spinal cord and pituitary. *J. of Neurosc.* Vol. 3, No. 11: 2146-2152.

- Consolazione, A., Bentivoglio, M., Goldstein, M. and Toffano, G., 1985. Evidence for crossed catecholaminergic projections by combining wheat germ agglutinin horseradish peroxidase retrograde transport and tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. *Brain Res.* 338: 140-143.
  
- Cooper, S., Jackson, A. and Kirkham, T. 1985. Endorphins and food intake: kappa opioid receptor agonist and hyperphagia. *Pharmac. Biochem. and Behavior* 23: 889-901.
  
- Corbett, A. D., Paterson, S. J., McKnight, A. T., Magnan, J. and Kosterlitz, H. W., 1982. Dynorphin 1-8 and dynorphin 1-9 are ligands for the kappa-subtype of opiate receptor. *Nature* 299, 5878: 79-81.
  
- Cowan, W. H. and Powell. T. P., 1966. Striato-pallidal projection in the monkey. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 29: 426-439.
  
- Creese, I. 1982. Dopamine receptors explained. *TINS.* 40-43.
  
- Cuello, A. C. and Iversen, L. L. 1978. Interactions of dopamine with other neurotransmitters in the rat substantia nigra: a possible functional role of dendritic dopamine. In *Interactions between putative neurotransmitters in the Brain*, (Eds. Grattini, S., Pujol, J. F. and Samanin, R.) Raven Press, N. Y. 127-149.
  
- Chalmers, A., McGeer E. G., Wickson, V. and McGeer, P. L., 1970. Distribution of glutamic acid decarboxylase in the brain of various mammalian species. *Comp. Gen. Pharmacol.* 1: 385-390.
  
- Chavkin, C., James, I. F. and Goldstein, A., 1982a. Dynorphin is a endogenous ligand of the kappa-opioid receptor. *Science* 215: 413-415.

- Chavkin, C., Bakhet, C. and Bloom, F E., 1982b. Evidence for Dynorphin-as a neurotransmitter in rat hippocampus. *Life Sci.* 33, Supp. 1: 13-16.
  
- Chavkin, C., Henriksen, S. J., Siggins, G. R. and Bloom, F E., 1985. Selective inactivation of opioid receptor in rat hippocampus demonstrates that dynorphin-A and -B may act on mu-receptor in CA 1 region. *Brain Res.* 331: 366-370.
  
- Cheramy, A., Leviel, V. and Glowinski, J., 1981. Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature (Lond.)* 289: 537-542.
  
- Childs, J. A. and Gale, K., 1983. Neurochemical evidence for a nigrotegmental GABAergic projection. *Brain Res.* 258: 109-114.
  
- Dahlstrom, A. and Fuxe, L., 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* 62: Suppl. 232: 1-55.
  
- Del Fiacco, M., Paxinos, G. and Cuello, C., 1982. Neostriatal enkephalin-immunoreactive neurons project to the globus pallidus. *Brain Res.* 231: 1-17.
  
- Deniau, J. M., Hammond, C., Riszsk, A. and Feger, J., 1978b. Electrophysiological properties of identified output of the rat substantia nigra (pars compacta and pars reticulata): Evidence for the existence of branched neurons. *Exp. Brain Res.* 32: 409-422.
  
- Deniau, J. M., Chevalier, G. and Feger, J., 1978. Electrophysiological study of the nigro-tectal pathway in the rat. *Neurosc. Lett.* 10: 215-220.
  
- Deniau, J. M., Kitai, S. T., Donoghue, J. P. and Grofová, I., 1982. Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. *Exp. Brain Res.* 47: 105-113.
  
- Dichiaro, G., Pocerddu, M. L., Norelli, M., Mulas, M. L. and Gessa, G. L., 1979. Evidence for GABAergic projection from the substantia nigra to the ventromedial thalamus and to the superior colliculus in the rat. *Brain Res.* 176: 273-284.

- Divac, I., Fonnum, F. and Storm-Mathisen, J., 1977. High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. *Nature (Lond.)*. 266: 377-378.
- Divac, I. 1983. Two levels of functional heterogeneity of the neostriatum. *Neurosci.*, 10: 1151-1155.
- Doudet, D., Gross, C., Seal, J. and Biovilac, B., 1984. Activity of nigral dopaminergic neurons after lesion of the neostriatum in rats. *Brain Res.* 302: 45-55.
- Dray, A., Gonye, T. J., Oakley, N. R. and Tanner, T., 1976. Evidence for the existence of a raphe projection to the substantia nigra in rat. *Brain Res.* 113: 45-57.
- Dray, A., 1979. The striatum and substantia nigra: a commentary on their relationships. *Neurosci.* 4: 1407-1439.
- Faden, A. I. and Jacobs, T. P. 1983. Dynorphin induces partially reversible paraplegia in the rat. *Eur. J. Pharmac.* 91: 321-324.
- Faden, A. I. and Jacobs, T. P., 1984. Dynorphin-related peptides cause motor dysfunction in the rat through a non-opiate action. *Br. J. Pharmacol.* 81: 271-276.
- Falck, B., Hillarp, N.A., Thiens, G. and Torp, A., 1962. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* 10: 348-354.
- Fallon, A. M. and Moore, R. Y., 1978. Catecholamine innervation of the basal forebrain IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 180: 545-580.
- Faull, R. L. and Mehler, W.R., 1978. The cells of origin of nigrotectal, nigrothalamic and nigrostriatal projection in the rat. *Neurosci.* 3: 989-1002.

- Fischli, W., Goldstein, A., Hunkapillier, M. and Hood, L., 1982. Isolation and amino sequence analysis of a 4,000-dalton dynorphin from porcine pituitary. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79: 5435-5437.
- Florey, E., 1961. Comparative Physiology: Transmitter substances. *Annu. Rev. Physiol.* 23: 501-528.
- Fonnum, F., Gottesfeld, Z. and Grofová, I., 1978. Distribution of glutamate decarboxylase, choline acetyltransferase and aromatic amino acid decarboxylase in the basal ganglia of normal and operated rats. Evidence for striato pallidal, striato peduncular and striato nigral GABAergic fibers. *Brain Res.*, 143: 125-128.
- Fox, C. A., Andrade, A. N., LuQui, I. and Rafols, J., 1974. The primate globus pallidus: a Golgi and electron microscope study. *J. Hirnforsch.* 15: 75-93.
- Garant, D. and Gale, K. 1985. infusion of opiates into substantia nigra protects against maximal electroshock seizures in rats. *J. of Pharmac. and Exp. Ther.* 234: 45-48.
- Garant, D. and Gale, K. 1986. Intranigral muscimol attenuates electrographic signs of seizure activity induced by intravenous bicuculine in rats. *Eur. J. of Pharmac.* 124: 365-369.
- García-Munoz, M., Nicolau, N.M., Tulloch, J.F., Wright, A.K. and Arbuthnott, G.W. 1977. Feedback loop on output pathway in striato-nigral fibers?. *Nature*, 265: 363-365.
- García-Muñoz, M., 1983. Los ganglios basales y la voluntad sin control. *Ciencia y Desarrollo* 48: 97-104.
- Garzón, J., Sánchez-Blazquez, P., Gerhart, J., Loh, H.H. and Lee, N. M., 1984. Dynorphin effect on other opiate ligand binding in the mouse brain. *Biochem. Pharmacol.* 33: 2609-2614.

- Gerfen C. R., Staines, W. A., Arbuthnott, G. W. Fibiger, H. C., 1982. Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *J. Com. Neurol.* 207: 283-303.
- Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L., Hunkapilleir, M. and Hood, L., 1979. Dynorphin (1-13) an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 76: 6666-6670.
- Goldstein, A., Fischli, W., Lowney, L. I., Hunkapillier, M. and Hood, K., 1981. Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 78, No. 11: 7219- 7223.
- Gosnell, B., Levine, A. and Morley, J. 1986. The stimulation of food intake by selective agonist of mu, kappa and delta opioid receptors. *Life Sci.* 38: 1081-1088.
- Grace, A. and Bunney, B. S. 1979. Paradoxical GABA excitation on nigral dopaminergic cells: indirect mediation through reticulata inhibitory neurons. *Eur. J. Pharmac.* 59: 211.
- Graybiel, A. M., 1977. Direct and indirect pathways of the brainstem: an autorradiographic study of the pontine reticular formation in the cat. *J. Comp. Neurol.* 175: 37-78.
- Graybiel, A. M., 1978. Organization of the nigrotectal connections: an experimental trace study in the cat. *Brain Res.* 143: 339-348.
- Graybiel, A. M. and Ragsdale, C. W., 1978. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkey and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 75: 5723-5726.
- Graybiel, A. M. and Ragsdale, C.W., 1978. Striosomal organization of the caudate nucleus. I Acetylcholinesterase histochemistry of the striatum in the cat, rhesus monkey and human being. *Neurosc. Abstr.* 4: 44.

ESTI  
SALIR  
DEBE  
TECA

- Graybiel, A. M., Ragsdale, C. W. and MoonEdley, S., 1979. Compartments in the striatum of the cat observed by retrograde cell-labeling. *Exp. Brain Res.* 34: 189-195.
- Graybiel, A. M. and Ragsdale, C. W. 1979. Fiber connections of the basal ganglia. *Prog. Brain Res.* 51: 239-283.
- Graybiel, A. M., Ragsdale, C. W. and Yoneoka, E. S. 1981. An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining. *Neurosc.* 6: 337-397.
- Graybiel, A.M., 1986. Some patterns of connectivity in the central nervous system: a tribute to Rafael Lorente de N6. In: *Integration in the Nervous system.* Wilson, V. and Asanuma M. (Eds). In press.
- Grofova, I. and Rinwick, E., 1970. An experimental electron microscopic study on the striatonigral projection in the cat. *Exp. Brain Res.* 11: 249-262.
- Grofova, I., 1975. The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 91: 286-291.
- Grofova, I., 1979. Extrinsic connections of the neostriatum. In: *The neostriatum*, Divac and Oberg (Comp.) Pergamon Press, Oxford.
- Guyenet, P.G. and Aghajanian, G.K., 1978. Antidromic identification of dopaminergic and other output neurons of rat substantia nigra. *Brain Res.* 150: 69-84.
- Hartman von Monakow, K., Kert, K. and Künzle, H., 1978. Projection of the precentral motor cortex and other cortical areas of the frontal lobe to the subthalamic nucleus in the monkey. *Exp. Brain Res.* 33: 395-403.

- Hassler, R., Bak, I. J., Usunoff, K. J. and Choi, W. B., 1975. Synaptic organization of the descending and ascending connections between the striatum and the substantia nigra in the cat. In: Boissier, J. R., Hippius, H. and Pichot, P. (Eds.). Neuropharmacology, Vol. 359. Eceptta Medica, Elsevier, Amsterdam.
- Hattori, T., Fibiger, H. C. and McGeer, P. L., 1975. Demonstration of a pallidal-nigral projection innervating dopaminergic neurons. J. Comp. Neurol. 162: 487-504.
- Hattori, T., McGeer, P. L. and McGeer, E. G., 1976. Synaptic morphology in the neostriatum of the rat: possible serotonergic synapse. Neurochem. Res. 11: 451-46.
- Hedreen, J. C. and Chalmers, J. P., 1972. Neuronal degeneration in rat brain induced by 6-hydroxydopamine; a histological and biochemical study. Brain Res. 47: 1-36.
- Henriksen, S. J., Chouvet, G. and Bloom, F. E., 1982. In vivo cellular responses to electrophoretically applied dynorphin in the rat hippocampus. Life Sci. 31: 1785-1788.
- Herkenham, M. and Nauta, W. J., 1977. Afferent connections of the habenular nuclei in the rat; a horseradish peroxidase study with a note on the fiber of passage problem. J. Comp. Neurol. 173: 123-146.
- Herman, B. and Goldstein, A. 1984. Antinociception and paralysis induced by intrathecal dynorphin A. J. of Pharmac. and Exp. Ther. 232: 27-32.
- Herrera-Marchitz, M., Hokfelt, T., Ungersted, U., Terenius, L. and Goldstein M., 1984. Effect of intranigral injections of dynorphin, dynorphin fragments and alpha-neo-endorphin on rotational behaviour in the rat. Eur. J. Pharmacol. 102: 213-227.

- Hommer, D. W. and Pert, A., 1983. The actions of opiates in the rat substantia nigra: an electrophysiological analysis. *Peptides*. 4: 603-608.
  
- Hong, J. S., Yang, H.Y. and Costa, E., 1977a. Determination of the methionine enkephalin in discrete regions of rat brain. *Brain Res.* 134: 383-386.
  
- Hong, J. S., Yang, H. Y., Racagni, G. and Costa E., 1977b. Projections of substance P containing neurons from neostriatum to substantia nigra. *Brain Res.* 122: 541-544.
  
- Hornykiewicks, V., 1966. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol.Rev.* 18: 925-964.
  
- Houde, R.W., 1979. Analgesic effectiveness of the narcotic agonist - antagonist. *Br. J. Pharmac.* 7: 2975-3085.
  
- Hutchinson, M., Kosterlitz,, H. W., Leslie, F. M., Waterfield, A. A. and Terenius, L., 1975. Assessment in the Guinea-pig ileum and mouse vas deferens of Benzomorphans which strong antinoceptive activity but do not substitute from morphine in the dependent monkey. *Br. J. Pharmacol.* 55: 541.
  
- Jones, E. G. and Wise, S. P., 1977. Size, laminar and columnar distribution of efferent cells in the sensory motor cortex of monkeys. *J. Comp. Neurol.* 175: 391-438.
  
- Jackson, A. and Cooper, S. The involvement of the kappa opiate receptor in the control of food intake in the rat. *Neuropharmac.* 25: 653-654.
  
- Jones, E. G., Coulter, J. D., Burton, H. and Porter, R. 1977. Cells of origin and terminal distribution of corticostriatal fibers arising in the sensory-motor cortex of monkeys. *J. Comp. Neurol.* 173: 53-80.
  
- Kanazawa, I., Emson P. C. and Cuello A. C., 1977b. Evidence for the existence of substantia P containing fibers in striato-nigral and pallido-nigral pathways in rat brain. *Brain Res.* 119: 447-453.

- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi, S. and Numa, S. 1982. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine alpha-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature*, 298: 245-249.
- Kawai, Y., Takagi, H., Kumoi, Y., Shiosaka, S. and Tohyama, M. 1987. Nigrostriatal dopaminergic neurons receive substance P-ergic inputs in the substantia nigra: application of the immunoelectron microscopic mirror technique to fluorescent double-staining for transmitter-specific projections. *Brain Res.* 401: 371-376.
- Kilpatrick I. C., Starr, M. S., Fletcher, A., James, T. A. and McLeod N. K., 1980. Evidence for GABAergic nigrothalamic pathway in the rat. I. Behavioural and biochemical studies. *Exp. Brain Res.* 40: 45-54.
- Kim J. S., Bak I. J., Hassler, R. and Okada, Y., 1971. Role of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system. 2.- Some evidence for the existence of a type of GABA-rich strionigral neurons. *Exp. Brain Res.* 14: 95-104.
- Kim, R., Nakano, K., Jarayama, A. and Carpenter, M. B., 1976. Projection of the globus pallidus and adjacent structures: an autoradiographic study in the monkey. *J. Comp. Neurol.* 169: 263-290.
- Kitai, S. T., Kocsis, J. D., Preston, R. J., Sugimori, M., 1976. Monosynaptic inputs to caudate neurons identified by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 109: 601-666.
- Konig J. R. and Klippel, R. A., 1963 *The rat brain: A Stereotaxic Atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem.* Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Krettek, J. E. and Price, J. L., 1979. Amigdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J. Comp. Neurol.* 24: 414-427.

- Künzle, H., 1975. Bilateral projection from precentral cortex to the putamen and the other parts of the basal ganglia. *Exp. Brain Res.* 88: 195-210.
  
- Li, S., Sivam, S. P. and Hong, S., 1986. Regulation of the concentration of dynorphin 1-8 in the striatonigral pathway by the dopaminergic system. *Brain Res.* 398: 390-392.
  
- Lindvall, D. and Bjorklund, A., 1974. The organization of the ascending catecholamine neuron system in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 412: 1-48.p
  
- Lord, J. A. H., Waterfield, A. A., Hughes, J. and Kosterlitz, H. W. 1977. Endogenous opioid peptides: multiple agonist and receptors. *Nature* 267: 495-499.
  
- Lundberg, J. M. and Hoekfelt, T., 1983. Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *TINS* 6, 8: 325-333.
  
- Mahler, L., Fibiger, H. C. and McGeer, P. L., 1973. Demonstration of the nigrostriatal projection by silver staining after nigral injection of 6-hydroxydopamine. *Exp. Neurol.* 40: 505-515.
  
- Martin, W.R., Eades, C. G., Thompson, J. A., Huppler, R. E. and Gilbert, P.E. 1976. The effects of morphine- and nalorphin-like drugs in the non-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 197: 517-532.
  
- McGeer, E. G., Fibiger, H. C., McGeer, P. L. and Brooke, S., 1973. Temporal changes in amine synthesizing enzymes of rat extrapyramidal structures after hemitransections or 6-hydroxydopamine administration. *Brain Res.* 52: 284-300.
  
- McGeer, P. L. and McGeer, E. G., 1976. Enzymes associated with the metabolism of catecholamines, acetylcholine and GABA in human controls and patients with Parkinson's disease and Huntington's chorea. *J. Neurochem.* 26: 65-76.

- McGeer, P. L., McGeer, E. G., Scheer, V. and Singh, K., 1977b. A glutamatergic corticostriatal path?. Brain Res. 128: 369-373.
- McGeer, E. G., McGeer, P. L. and Vincent, S. R., 1982. GABA enzymes and pathways. In: Bradford, A. F. (Ed.) Neurotransmitters Interaction and Compartmentation, Nato Advanced study Institute, Serie A, Vol. 48. Plenum Press. New York and London.
- McGeer, E. G., Staines, W. A. and McGeer, P. L., 1984. Neurotransmitters in the basal ganglia. Canad. J. Neurol. Sci. 11: 89-99.
- Mehler, W. R., 1966. Further notes on the centre median nucleus of the Luys. In: Purpura, Yahr. The thalamus. Columbia University Press. New York. 109-127.
- Mehler, W. R., 1981. The Basal Ganglia. Applied Neurophysiology. 44: 261-290.
- Nagai, T. McGeer, E. G., 1983. Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. J. Comp. Neurol. 218: 220-238.
- Nagy, J. I., Carter, D. A. and Fibiger, H. C. 1978. Anterior striatal projections to the globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra in the rat: the GABA connections. Brain Res. 158: 15-29.
- Nauta, W. J. and Mehler, W. R., 1966. Projection of lentiform nucleus in the monkey. Brain Res. 11: 3-42.
- Nauta, W. J. and Domesik, V. B. 1971. Crossroads of limbic and striatal circuitry: hypothalamo-nigral connection. In Limbic Mechanism, (Eds. Livingston, K.E. and Hornykiewicks, O.) Plenum Press, London. 75-93.
- Nauta, W. J. and Cole, M., 1974. Efferent projections of the subthalamic nucleus. Trans. Amer. Neurol. Ass. 99: 170-173.

- Nicoll, R.A., Alger, B. E. and Jahr, C., 1980. Enkephalin blocks inhibitory pathways in the vertebrate CNS. *Nature* 287: 22-25.
- Nilaver, G., Hoffman, D. L. and Zimmerman, E. A., 1979. Multiple projections of the magnocellular hypothalamus to other brain regions including cerebral cortex. *Trans. Amer. Neurol. Assoc.* 104: 205-208.
- Nylander. I. and Terenius, L. 1986. Chronic haloperidol and clozapine differentially affect dynorphin peptides and substance P in basal ganglia of the rat. *Brain Res.* 380: 34-41.
- Oka, T., Negishi, K., Suda, M., Sawa, A., Fujino, M. and Wakimasu, M., 1982. Evidence that dynorphin (1-13) acts as an agonist on opioid kappa-receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 77: 137-141.
- Olanas, M. C., DeMontis, G. M., Mulas, G. and Tagliamonte, A. 1978. The striatal dopaminergic function is mediated by inhibition of a nigral, non-dopaminergic neuronal system via a striatonigral GABAergic pathway. *Eur. J. Pharmac.* 49: 233.
- Otsuka, M. and Konishi, S., 1983. Substance P, the first peptide neurotransmitter?. *TINS* Vol. 6, No. 8 317-320.
- Palkovitz, M., Brownstein, M. J. and Zamir, N. 1984. The origin of dynorphin and alpha-neo-endorphin in the substantia nigra. *Neuropeptides.* 4: 193-199.
- Papez, J. W., 1929. *Comparative neurology.* Thomas, Y.C. New York.
- Papez, J. W., 1941. A summary of fiber connections of the basal ganglia with each other and with other portions of the brain. In: *The Diseases of the basal ganglia.* Putnam, T. J., Frantz, A. M. and Ranson, S. W. (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, H. D. 21-68.
- Passik, P., Passik, T., Difiglia, M. 1979. The internal organization of the neostriatum in mammals. In: *the neostriatum I.* Divac and Oberg (Eds.) Pergamon Press, Oxford 5-36.

- Patiño, P. and Garcia-Munoz, M., 1985. Electrophysiological thalamic responses evoked by dopamine-receptor stimulation into the striatum. *Brain Res.* 361: 1-9.
- Pickel, V. M., Tong, H. J. and Reis, D. J., 1976. Monoamine synthesizing enzymes in central dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurons. *J. Histochem. Cytochem.* 24: 792-806.
- Powell, T. F. and Cowan, W. H., 1956. A study of thalamo-striate relations in the monkey. *Brain Res.* 79: 364-390.
- Pritzel, M., Huston, J. P. and Sarter, M., 1983. Behavioral and neuronal reorganization after unilateral substantia nigra lesions: evidence for increased interhemispheric nigrostriatal projections. *Neurosci.* 9: 879-888.
- Przewlocka, B., Stala, L., Lasón, W. and Przewlocki, R., 1983. The effect of various opiate receptor agonist on the seizures threshold in the rat. Is dynorphin an endogenous anticonvulsant?. *Life Sci.* 33, Supp. 1: 595-598.
- Przewlocki, R., Lasón, W., Stach, R. and Kacz, D., 1983. Opioid peptides, particularly dynorphin, after amigdaloid-kindled seizures. *Regulatory peptides* 6: 385-392.
- Ragsdale, C. W., Graybiel, A. M., 1981 The fronto-striatal projection in the cat and monkey and its relationship to inhomogeneities established by acetylcholinesterase histochemistry. *Brain Res.* 208: 259-266 .
- Riback, C. E., Vaughn, J. E., Saito, K., Barber, R. and Roberts, E., 1977. Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat substantia nigra. *Brain Res.* 116: 287-289.
- Rinvik, E. and Walberg, I., 1969. Is there a cortico-nigral tract? A comment based on experimental electron microscopic observations in the cat. *Brain Res.* 14: 742-744.
- Scarnati, E., Campara, E. and Pacitti, C. 1983. The functional role of the nucleus accumbens in the control of the substantia nigra: Electrophysiological investigations in intact and striatum-globus pallidus lesioned rats. *Brain Res.* 265: 249-257.

- Sanderson, P., Mavoungou, R. and Albe-Fessard, D., 1986. Changes in substantia nigra pars reticulata activity following lesions of the substantia nigra pars compacta. *Neurosc. Lett.* 67: 25-30.
- Starr, M. S. and Kilpatrick, I. C., 1981. Distribution of gamma-aminobutyrate in the rat thalamus: specific decrease in thalamic gamma-aminobutyrate following lesions or electrical stimulation of the substantia nigra. *Neurosc.* 6: 1095-1104.
- Sofroniew, M. V., 1980. Projections from vasopresin and neurophysin neurons to neural targets in the rat and human. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 475-478.
- Somogyi, P., Bolam, J. P. and Smith, A. D., 1981. Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striato-nigral neurons. A light and electron microscopy study using the Golgi-peroxidase transport-degeneration procedure. *J. Comp. Neurol.* 195: 567-584.
- Swanson, L. W. and Cowan, W. M., 1975. A note on the connections and development of the nucleus accumbens. *Brain Res.* 92: 324-330.
- Trulsson, E., Cannon, M. S. and Ralke, J., 1985. Identification of dopamine-containing cell bodies in the dorsal and median raphe nuclei of the rat brain using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. *Brain Res. Bull.* 15: 229-234.
- Ungersted, U., 1971. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 367: Suppl. 1: 1-48.
- Van der Kooy, D. and Hattori, D., 1980. Subthalamic nucleus neurons project to both the globus pallidus and substantia nigra in rat. *J. Comp. Neurol.* 192: 751-768.
- Van der Kooy, D., Coscina, D. V. and Hattori, T., 1981. Is there a non-dopaminergic nigrostriatal pathways?. *Neurosc.* 6: 345-357.

- Vicq d'Azyr 1867 tomado de: Dray, A. and Straughan, D. W. 1976. Synaptic mechanism in the substantia nigra. J. Pharm. Pharmac. 28: 400-405.
- Vincent, S. R., Hattori, T. and McGeer, E. G., 1978. The nigro-tectal projection: A biochemical and ultraestructura characterization. Brain Res. 151: 159-164.
- Vincent, S. R., Hattori, T. and McGeer E. G. 1978. The nigro-tectal projections: A biochemical and ultraestructural characterization. Brain Res. 151: 159-164.
- Vincent, S., Hoekfelt, T., Christensson, I. and Terenius, L., 1982. Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striato-nigral pathway. Eur. J. of Pharmacol. 85: 251-252.
- Voneida, T. J., 1960. An experimental study of the course and destination of fibers arising in the head of the caudate nucleus in the cat and monkey. J. Comp. Neurol. 115: 75-87.
- Waddington, J. L. and Cross, A. J. 1978. Denervation supersensitivity in the striatonigral GABA pathway. Nature 276: 618-620.
- Watson, S. J., Akil, H., Sullivan, S. and Barchas, J.D., 1977. Immunocytochemical localization of methionine enkephalin. Life Sci., 21: 733-738.
- Weber, E., Evans, C. J. and Barchas, J. D., 1983. Multiple endogenous ligands for opioid receptors. TINS Vol. 6, No. 8: 333- 336.
- Weber, E. and Barchas, J. D., 1983. Immunohistochemical distribution of dynorphin B in rat brain: relation to dynorphin A and alpha-neo-endorphin systems. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) Vol. 80: 1125-1129.
- Werz, M. A. and MacDonald, R. I., 1984. Dynorphin reduces calcium-dependent action potential duration by decreasing voltage-dependent calcium conductance. Neurosc. Lett. 46: 185-190.

- Wood, P.L., Charleson, S., Lane, D. and Hudgin, R. L. 1981. Multiple opiate receptors: differential binding of mu, kappa and delta agonist. *Neuropharmac.* 20: 1215-1220.
- Young, S., 1973. *Electronics in the Life Science*. Macmillan Press Ltd. London.
- Young, E., Walker, M., Lewis, M., Houghten, R., Woods, J. and Akil, H. 1986. (3H) dynorphin a binding and kappa selectivity of prodynorphin peptides in rat, Guinea-pig and monkey brain. *Eur. J. Pharmacol.* 121: 355-365.
- Zamir, N., Palkovitz, H. and Brownstein, M. J., 1983. Distribution of immunoreactive dynorphin in the central nervous system of the rat. *Brain Res.* 280: 81-93.