



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"I Z T A C A L A"

RECEPTORES GABAERGICOS PRESINAPTICOS
EN LA SUSTANCIA NIGRA DE LA RATA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
CESAR JUAN ARMANDO NAVA ASBELL

México,

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECEPTORES GABAERGICOS PRESINAPTICOS EN LA
SUSTANCIA NIGRA DE LA RATA.

Tesis que para obtener el grado de licenciado en Biología
presenta

CESAR JUAN ARMANDO NAVA ASBELL

Director de Tesis: M. en C. Benjamín Florán Garduño.

Este trabajo fué realizado en el laboratorio
13 del Departamento de Fisiología, Bifísica y
Neurociencias del Centro de Investigación y
Estudios Avanzados del I.P.N.

Parte de los resultados que integran esta tesis, fueron presentados en los siguientes trabajos:

Nava, C., Florán, B. y Aceves, J. (1987). Acople entre receptores a benzodiazepinas y autorreceptores presinápticos gabaérgicos en la sustancia nigra compacta de la rata. XXX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Jalapa, Ver.

Nava-Asbell, C., Florán, B., Arias-Montaño, A., Martínez-Fong, D. y Aceves, J. (1988). Modulación de la liberación de GABA en la pars reticulata de la sustancia nigra por dopamina endógena. XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Querétaro, Qro.

Florán, B., Silva, I., Nava, C. y Aceves, J. (1988). Presynaptic modulation of the release of GABA by GABA^A receptors in pars compacta and by GABA^B receptors in pars reticulata of the rat substantia nigra. European Journal of Pharmacology. 150: 277-286.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al M. en C. Benjamín Florán Garduño, director de esta tesis, por su interés, apoyo y confianza durante la realización de la misma.

Al Dr. Jorge Aceves Ruiz, por las facilidades brindadas en su laboratorio para la realización de este trabajo.

A Arturo Sierra por el tiempo cedido gentilmente para la obtención de las rebanadas utilizadas en los experimentos.

Al M. en C. Isaac Silva Barrón por su valiosa colaboración en la realización de los experimentos y procesamiento de datos.

A los revisores de este trabajo:

Biol. Enrique Bañuelos Sánchez.

Biol. José Lizarde Sandoval.

M. en C. Bertha Segura Alegría.

Biol. René Arzuffi Barrera.

A todos los compañeros y amigos del laboratorio 13 del Departamento de Fisiología.

Dedico este trabajo:

A mis padres:

César Nava López (in memoriam).

Luz María Asbell Juárez.

por darme todo para ser lo que soy.

A mis hermanos:

Marilú

Araceli

Rosa María

Fernando

Martha Elba

Norma Delia

con cariño.

A mi compañera Lilia R. R.

por su confianza y apoyo.

A mis compañeros y profesores.

El que tenga una canción tendrá tormenta,
el que tenga compañía, soledad;
el que siga buen camino tendrá sillas
peligrosas que lo inviten a parar;

pero vale la canción, buena tormenta
y la compañía vale soledad,
siempre vale la agonía de la prisa
aunque se llene de sillas la verdad.

Historia de las sillas.

S. Rodríguez.

INDICE.

INTRODUCCION.....	1
Receptores presinápticos.....	1
Tipos de receptores presinápticos.....	1
Mecanismo de los receptores presinápticos.....	2
Importancia funcional.....	5
ANTECEDENTES.....	7
Receptores gabaérgicos.....	7
autorreceptores gabaérgicos.....	11
Organización funcional de la sustancia nigra...	13
caracterización morfológica.....	14
Relaciones sinápticas de la sustancia nigra....	16
vias nigrales aferentes.....	16
vias nigrales eferentes.....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
MATERIALES Y METODOS.....	25
Preparación.....	25
Procedimiento experimental.....	26
Manejo de resultados.....	29
Análisis estadístico.....	31
Soluciones.....	31
RESULTADOS.....	33
DISCUSION.....	44

CONCLUSIONES.....	48
APENDICE.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	56

INTRODUCCION.

RECEPTORES PRESINAPTICOS.

La transmisión de la información en las células del sistema nervioso se realiza mediante el efecto producido por mensajes de naturaleza química (neurotransmisores) en las estructuras conocidas como receptores los cuales son complejos moleculares de naturaleza protéica que se encuentran en la superficie externa de la membrana neuronal incluyendo el soma, dendritas, axón y terminales axónicas (Starke, 1981). No obstante, solo se han contemplado a dos grupos de receptores como los de mayor importancia fisiológica, considerando que son los que regulan la actividad neuronal. Estos grupos son:

1) Los receptores somatodendríticos localizados en el cuerpo celular y dendritas y que al ser activados modifican la función de la región en donde se encuentran como la síntesis de proteínas y la generación de potenciales de acción.

2) Los receptores presinápticos, localizados en las terminales axónicas y que al ser activados modifican la función de la región terminal, como la síntesis del neurotransmisor así como el aumento o disminución en la liberación del mismo.

Tipos de receptores presinápticos.

Al observar que la liberación del neurotransmisor puede producirse independientemente de la presencia de potenciales de

acción, Katz y Miledi (1979), sugirieron que dicho proceso podía estar mediado por el transmisor mismo o bien, dada la intrincada red de conexiones sinápticas en el sistema nervioso central, por sustancias neurotransmisoras diferentes que pueden provenir incluso de terminales nerviosas distantes (Starke, 1979).

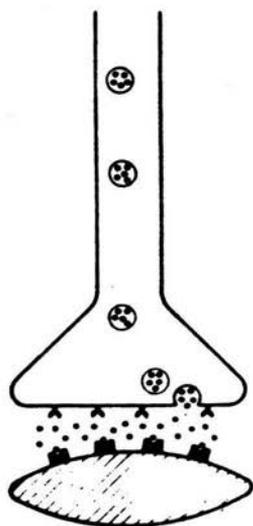
Con base a lo anterior se ha postulado que los receptores presinápticos pueden ser "autorreceptores" cuando se activan por el mismo neurotransmisor liberado o por sus agonistas o antagonistas farmacológicos específicos y "heterorreceptores" cuando la activación se efectúa por una molécula neurotransmisora diferente a la liberada por la terminal nerviosa (ver Fig. 1).

Actualmente se han efectuado múltiples trabajos para la identificación y caracterización de autorreceptores y heterorreceptores presinápticos como moduladores de la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central, en sinaptosomas y en rebanadas de diferentes núcleos del cerebro y su localización se ha hecho evidente en terminales nerviosas noradrenérgicas, dopaminérgicas, colinérgicas y serotoninérgicas (Starke, 1981; Chesselet, 1984).

Mecanismo de los receptores presinápticos.

El mecanismo o los mecanismos de acción de los receptores presinápticos no han podido ser explicados de manera satisfactoria debido principalmente a que las terminales nerviosas son muy pequeñas y comprenden una fracción reducida del

autoreceptors



presynaptic heteroreceptors

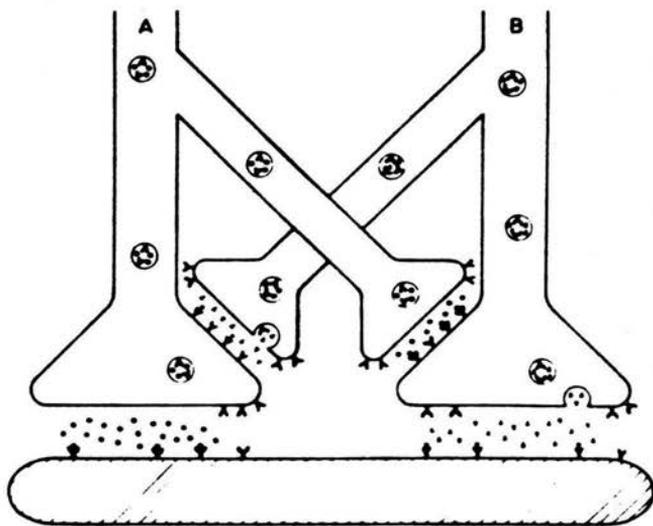


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes tipos de receptores presinápticos en las terminales nerviosas del sistema nervioso central.

tejido en que se encuentran.

Stjarne (1978), ha propuesto un mecanismo que implica un proceso de inhibición por retroalimentación, moderado por la liberación del neurotransmisor endógeno el cual produce una hiperpolarización de la terminal siguiendo de una depresión de la propagación del estímulo en la misma, con la consecuente activación de un número menor de botones sinápticos o varicosidades. Esto se apoya en la observación de que las drogas antagonistas, que interrumpen el asa de retroalimentación, facilitan considerablemente la liberación de noradrenalina producida por estimulación eléctrica en vaso deferente de hamster (Stjarne, 1978) y por la disminución en la liberación de acetilcolina por morfina la cual inhibe la propagación del impulso excitando un número menor de terminales en neuronas entéricas (Szerb, 1980).

Se ha considerado también la participación de canales iónicos como sistemas efectores de los receptores presinápticos; por ejemplo, es posible que la activación de estos últimos afecte de manera inhibitoria el acople electrosecretor, particularmente en el influjo de iones calcio a través de canales dependientes de voltaje, lo cual ha sido demostrado para terminales noradrenérgicas, serotoninérgicas y colinérgicas (Starke, 1981).

En cuanto al complejo receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA), se ha reportado que además de estar acoplado a un canal para el ión cloruro, puede estar compartiendo canales para otros

iones con receptores presinápticos para neurotransmisores diferentes (Yarowsky y Carpenter, 1978).

Finalmente, es probable que una despolarización pueda reducir la liberación de neurotransmisor debido a una disminución en la amplitud del potencial de acción en la terminal axónica (Starke, 1981).

Importancia funcional.

Aún cuando se ha cuestionado que la presencia de receptores en la terminal axónica esta determinada por la necesidad de éstos en la región somato-dendrítica y que su expresión obedece tan solo a cuestiones de economía celular en la diferenciación de su membrana, la principal función aparente de los receptores presinápticos, es la modulación o regulación de la actividad de las terminales nerviosas (síntesis del neurotransmisor y liberación del mismo) dependiendo de la presencia en el medio de algunos compuestos. Estos pueden ser: 1) el neurotransmisor u otros agentes liberados al surco sináptico por la propia neurona, 2) moléculas provenientes de células nerviosas adyacentes o 3) por substancia originadas en zonas distantes del organismo como es el caso de algunas hormonas.

Cabe considerar a este respecto, que la mayoría de los experimentos que apoyan el concepto fisiológico de los receptores presinápticos, han sido realizados in vitro, facilitando o bien dificultando el acceso de neurotransmisor, agonistas o

antagonistas a los receptores de una manera no operativa en condiciones in vivo.

Por tanto, es necesaria la realización de estudios más profundos que expliquen claramente cuál es el papel que juegan los receptores presinápticos en la fisiología celular nerviosa de los animales íntegros.

ANTECEDENTES.

Receptores Gabaérgicos.

Actualmente, las investigaciones en neurobiología se han enfocado al estudio de las propiedades de los receptores para substancias neurotransmisoras auxiliándose en el refinamiento de técnicas electrofisiológicas y bioquímicas lo que ha aportado una gran cantidad de datos relacionados con las características bioquímicas, fisiológicas y farmacológicas de los receptores gabaérgicos. Con esto, un receptor se define como un elemento molecular de naturaleza protéica de la superficie externa de la membrana celular nerviosa, ya sea presináptica o postsináptica, que media la acción del ácido gamma-aminobutírico (GABA) después de ser liberado de las terminales nerviosas. Se ha establecido que el receptor gabaérgico esta constituido por al menos dos componentes: un sitio de reconocimiento de GABA y uno o varios canales iónicos, aunque es probable que presente elementos adicionales como los sitios de reconocimiento para picrotoxina, avermectina y benzodiazepinas (Gallagher y Shinnick-Gallagher, 1983).

Anteriormente, era necesario demostrar que una respuesta al GABA podia ser antagonizada por bicuculina o picrotoxina antes de involucrar la presencia de un receptor gabaérgico, sin embargo, en la actualidad parece que pueden existir varias clases de receptores para GABA que no son bloqueados por esas substancias

consideradas clásicas (Enna y Gallagher, 1983). Los receptores gabaérgicos sensibles a la bicuculina han sido clasificados como receptores gabaérgicos tipo "A" y que están localizados en cuerpos celulares, dendritas y terminales axónicas. La activación de estos receptores produce un cambio de polaridad en la célula dando como resultado una hiperpolarización o una depolarización de la neurona receptora. Por el contrario, los receptores gabaérgicos tipo "B" son insensibles a la bicuculina y se activan por el fármaco baclofén, y se encuentran principalmente sobre las terminales nerviosas de neuronas catecolaminérgicas y su activación parece inhibir la liberación del neurotransmisor, tal vez mediante la modificación del flujo de calcio al interior celular. Aunque los receptores de GABA pueden ser clasificados de diferentes maneras, las diferencias anatómicas, fisiológicas y farmacológicas entre receptores gabaérgicos tipo "A" y tipo "B" han sido claramente establecidas lo que los define como entidades moleculares diferentes (Bowery et al., 1980; Hill y Bowery, 1981; Bowery, 1983). Es necesario un mejor conocimiento de los receptores gabaérgicos para poder explicar los mecanismos clave de la acción receptora para el GABA.

No obstante que se desconoce el mecanismo por el cual los receptores presinápticos de cualquier tipo, modifican la liberación de neurotransmisor, estudios electrofisiológicos indican que los receptores gabaérgicos tipo "A" están acoplados a un canal para el ión cloruro produciendo, con la activación del

sitio de reconocimiento, un influjo o eflujo del anión, dependiendo de los gradientes de concentraciones (Enna y Gallagher, 1983; Krnjević, 1974; Nistri y Constantini, 1979). Los receptores tipo "A" localizados en el soma o dendritas regulan el paso del cloruro de tal forma que la activación del receptor origina una hiperpolarización y una disminución en la actividad de la célula. Por otra parte, los receptores gabaérgicos tipo "A" que se encuentran en las terminales axónicas, al activarse, ocasionan un eflujo neto de cloruro, lo cual produce una depolarización parcial que es referida como inhibición presináptica puesto que la cantidad de neurotransmisor liberado de los botones sinápticos parcialmente depolarizados se ve disminuida. Se ha descrito que la activación del receptor gabaérgico tipo "A" sincroniza la activación de canales para el ión cloruro cuya conductancia y tiempo de apertura son sensibles al voltaje (Segal y Barker, 1984; Gray y Johnston, 1985). Estudios bioquímicos y electrofisiológicos sobre el receptor gabaérgico tipo "A" sugieren que es un complejo macromolecular con varios componentes interactuantes como son: un sitio de reconocimiento para el GABA (al que se pueden unir análogos y antagonistas competitivos del GABA) ligado con un canal para Cl⁻, un receptor a barbitúricos (Willod y Johnston, 1983), un receptor a benzodiazepinas y un receptor a picrotoxina probablemente asociado al canal de Cl⁻ (Olsen, 1981; Iversen, 1984). En el animal intacto, la activación de estos receptores ha mostrado que

están asociados con acciones hipotensivas (De Feudis, 1983), anticonvulsivas (Morselli y Lloyd, 1983) y ansiolíticas (Williams, 1983).

La información existente acerca de los eventos iónicos asociados con la activación de los receptores gabaérgicos tipo "B", es menos conocida. Al parecer, la unión al sitio de reconocimiento requiere de la presencia de cationes divalentes (Hill y Bowery, 1981) y puesto que el receptor parece estar acoplado al proceso de liberación del neurotransmisor (Bowery et al., 1980, 1980a), es muy probable que los receptores tipo "B" puedan influenciar los niveles intracelulares de calcio, ya sea a través de un canal de Ca^{++} , o con alguna asociación a mecanismos de transporte de Ca^{++} , o con algún sitio de almacenamiento para este catión. Algunos autores han sugerido la asociación de este tipo de receptor con la activación de una corriente de potasio que no inhibe a la de calcio (Gahwiler y Brown, 1985).

La activación o inhibición selectiva de los receptores gabaérgicos en los ganglios basales puede alterar la actividad motora y el umbral de sacudidas (Gale y Casu, 1981), lo que sugiere que los receptores en esa región cerebral juegan un papel importante en la función extrapiramidal. Además de participar en las anormalidades de la actividad gabaérgica de los ganglios basales, se piensa que los receptores contribuyen a los desajustes motores asociados con algunos desórdenes neurológicos (Enna, 1981). El bloqueo de los receptores gabaérgicos por

bicuculina o picrotoxina, conduce a la excitación y convulsiones generalizadas demostrando la importancia del sistema gabaérgico para ejercer un efecto inhibitorio tónico sobre la actividad del sistema nervioso central. Dada la gran distribución de los receptores gabaérgicos, es muy probable que participen prácticamente en todas las funciones del sistema nervioso central, incluyendo a los mecanismos de afecto, conocimiento, actividad motora y respuestas sensoriales (Enna, 1983).

Autorreceptores gabaérgicos.

A pesar de que muchos estudios apoyan la existencia de autorreceptores y describen los efectos sobre la liberación inducida del neurotransmisor, tanto la estimulación, como el bloqueo de los autorreceptores y los mecanismos por los cuales la activación de estos reduce la liberación del neurotransmisor, son aún inciertos. Una hipótesis sugiere que la modulación de la liberación del transmisor por los autorreceptores y otros receptores presinápticos, puede deberse a una utilización mayor o menor de sitios de liberación (Ryan et al., 1985). Datos recientes han indicado que en el sistema nervioso periférico cada potencial de acción puede promover liberación del neurotransmisor en solo unos pocos sitios de liberación disponibles (Smith, 1983; Stjarne, 1978). También se ha supuesto que los autorreceptores presinápticos se encuentran sobre las varicosidades axónicas y que su activación altera la propagación del impulso, cambiando

probablemente la polarización de la membrana o su conductancia (Cunnane y Stjarne, 1982, 1984). A través de estudios bioquímicos se ha sugerido que los autorreceptores actúan no por un bloqueo en la conducción del potencial de acción, sino más bien por alteración de la magnitud del potencial inducido por la despolarización de la terminal o por la alteración de las corrientes iónicas dentro de la terminal (De Langen et al., 1979).

El sistema de modulación de la liberación de neurotransmisores por autorreceptores, también ha sido reportado para terminales noradrenérgicas (Dismukes y Mulder, 1976; Frankhuysen y Mulder, 1981, 1982), dopaminérgicas y colinérgicas (Iversen, et al., 1976; Starke, K., 1981).

Recientemente, los resultados experimentales han sugerido que la liberación de GABA a partir de terminales nerviosas centrales, esta sujeta a un control de retroalimentación negativa a través de receptores presinápticos presentes en terminales gabaérgicas (Mitchell y Martin, 1978; Brennan y Cantrill, 1979, 1979a; Brennan et al., 1981; Anderson y Mitchell, 1985; Arbilla et al., 1979). Estos trabajos, se han realizado utilizando compuestos capaces de activar de manera selectiva a los receptores gabaérgicos. Tal es el caso del muscimol, ácido 3-amino propano sulfónico y THIP como agonistas gabaérgicos de los receptores tipo "A" (Arbilla et al., 1979); baclofén, como agonista gabaérgico de los receptores tipo "B" (Hill y Bowery,

1981; Wilkin et al., 1981); bicuculina (Curtis et al., 1971; Johnston et al., 1972) y picrotoxina (Barker et al., 1983), como antagonistas gabaérgicos de los receptores tipo "A" y ácido 5-aminovalérico (Muhyaddin et al., 1982) y phaclofèn (Kerr et al., 1986) como antagonistas gabaérgicos de los receptores tipo "B".

No obstante la disponibilidad de estos compuestos, los efectos que presentan sobre el comportamiento de los autorreceptores gabaérgicos son aún cuestionados como se verá más adelante.

Organización Funcional de la Sustancia Nigra.

La sustancia nigra forma parte del tallo cerebral y aunque no se considera elemento de los ganglios basales, se encuentra relacionada funcionalmente con ellos pues presenta aferentes provenientes del núcleo estriado y del globo pálido, además de que sus eferentes retornan hacia el estriado y a diferentes sitios del tálamo que a su vez proyecta al estriado (Carpenter, 1983).

La comprensión de las funciones de los ganglios basales a estado determinada a partir de estudios clínicos en algunas enfermedades de origen nervioso. Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson, existe una degeneración de las células que contienen dopamina en la sustancia nigra, con pérdida de dopamina en esa región y en el núcleo estriado hacia el cual las células de la sustancia nigra proyectan (Sphepherd, 1979).

La inclusión del núcleo estriado (núcleo caudado y putamen), globo pálido y sustancia nigra en la patogénesis del síndrome de Parkinson y en la corea de Huntington a estimulado la investigación sobre sus relaciones sinápticas, identificación de neurotransmisores involucrados y caracterización de receptores en estas regiones cerebrales, las cuales están involucradas en el control de la postura y locomoción y en la neuropatología de los desórdenes en el andar, por lo que son blanco de acción de una gran variedad de agentes farmacológicos (Dray, 1979).

Caracterización morfológica.

La sustancia nigra (SN) es el núcleo mesencefálico de mayor tamaño que surge dorsalmente al pedúnculo cerebral extendiéndose a lo largo del mesencéfalo y se divide en dos partes: la sustancia nigra compacta (SNc), que es una región con una gran densidad de células que contienen pigmentos de melanina y la parte reticulata (SNr) con menor población celular.

Las células en ambas partes de la sustancia nigra, son de forma triangular o fusiformes y su tamaño oscila entre 15 y 50 μm en el gato y de 15 a 80 μm en los primates (Rinvik y Grofovà, 1970). Los gránulos de pigmento se dispersan en el citoplasma de las células más grandes en el hombre y primates. En la sustancia nigra de la rata han sido descritas tres tipos de neuronas: a) neuronas grandes distribuidas en la región reticulata, b) neuronas medianas en la región compacta y c) neuronas pequeñas de

axón corto localizadas en ambas porciones (Juraska et al., 1977). Las neuronas grandes se encuentran a lo largo de la sustancia nigra reticulata prevaleciendo especialmente en regiones rostralolaterales, donde están embebidas en un neuropilo de fibras finas no mielinizadas. Las neuronas medianas están estrechamente agrupadas en la sustancia nigra compacta pero están separadas por finas cubiertas astrocíticas. Las neuronas pequeñas son consideradas interneuronas y comprenden aproximadamente el 10% de la SNC y el 40% de la SNr.

Las neuronas nigrales vistas en preparaciones de Golgi, dan origen a dendritas lisas con pocas ramificaciones y radialmente largas (Rinvik y Grofovà, 1970). Las dendritas en las células de la SNC tienen una orientación dorsoventral principalmente dirigidas hacia la sustancia nigra reticulata, mientras que las dendritas de esta región, tienen una orientación rostrocaudal y se entrelazan con las de la región compacta. Aunque los axones de las neuronas nigrales son difíciles de impregnar con la técnica de Golgi, se han visualizado estructuras semejantes a axones que originan finas colaterales en ángulos rectos al axón principal (Schwyn y Fox, 1974).

Aunque la SNC y la SNr son innervadas por terminales gabaérgicas (Kim et al., 1971; Fonnum et al., 1974, 1978; Ribak et al., 1980; Van den Pol, et al., 1985), el origen de las terminales para ambas partes de la sustancia nigra parece ser diferente. Las células dopaminérgicas de la SNC recibe

terminales principalmente del globo pàlido y de la SNr, a través de colaterales o interneuronas (Hattori et al., 1975; Deniau, 1982), mientras que las células gabaérgicas (Kilpatrick et al., 1980; Childs y Gale, 1983) de la SNr, reciben terminales principalmente del neostriado (Grofová y Rinvik, 1970; Dray et al., 1976; Araki et al., 1985). Las células dopaminérgicas reciben también aferencia sináptica estriatal gabaérgica, que se efectúa sobre las dendritas que se encuentran en la SNr (Wasset, 1981). Esta diferente innervación en ambas partes de la sustancia nigra, podría estar asociada con una diferente modulación de la transmisión gabaérgica (Florán et al., 1988 y esta tesis).

Relaciones Sinápticas de la Sustancia Nigra.

Vías nigrales aferentes.

Aunque se ha asumido que la sustancia nigra recibe abundantes proyecciones corticales, esto no se ha hecho evidente con estudios de impregnación de plata y de microscopía electrónica (Rinvik, 1966; Rinvik y Walberg, 1969). Por otra parte, trabajos sobre transporte axoplásmico, sugieren que algunas proyecciones de la corteza prefrontal terminan en la sustancia nigra compacta (Bunney y Aghajanian, 1976). La sustancia nigra recibe fibras aferentes del estriado, del globo pàlido, del núcleo subtalámico, del núcleo dorsal del rafe y del núcleo pedunculopontino. Se ha reportado además, que el núcleo accumbens proyecta topográficamente sobre ambas divisiones de la

sustancia nigra (Swanson y Cowan, 1975; Nauta et al., 1978). Sin embargo, las proyecciones más importantes y abundantes son las dos primeras pues se ha reportado que la mayoría de las aferencias estriatonigrales, las cuales surgen del núcleo caudado y putamen (Voneida, 1960; Szabo, 1962, 1967, 1970), hacen sinapsis con la SNr (Rinvik y Brofovà, 1970; Kemp, 1970; Hattori et al., 1975). Las aferencias estriatales contienen como neurotransmisores al ácido gamma-aminobutírico, encefalinas (Diffligia, et al., 1982) y a la sustancia P (Groves, 1983). Por otra parte, se han presentado evidencias de una notoria proyección de fibras del globo pálido hacia diferentes regiones de la sustancia nigra compacta, por los grupos de Hattori (1975), Kanazawa (1976) y Kim (1976), las cuales son de naturaleza gabaérgica (Fonnum et al., 1974, 1978) y que contactan con las neuronas dopaminérgicas características de esta porción de la sustancia nigra (Hattori et al., 1975; Carter y Fibiger, 1978).

La sustancia nigra recibe además, aferencias del núcleo subtalámico, cuyas fibras proyectan hacia la región reticulata (Kanazawa et al., 1976; Carpenter et al., 1981a) y aún cuando se desconoce la naturaleza del neurotransmisor involucrado en este tipo de sinapsis, se ha podido identificar su naturaleza excitatoria (Hammon y Yelnik, 1983).

Con respecto al núcleo dorsal del rafe, se sabe que emite una proyección que innerva la porción reticulata de la sustancia nigra (Kuhar et al. 1972, Dray et al., 1976; Kanazawa et al,

1976) con terminales nerviosas probablemente de tipo serotoninérgico (Kuhar et al., 1972; Descarries et al., 1982).

En cuanto al núcleo pedúnculo pontino, solo se ha podido determinar que emite eferencias hacia la región rostral de la sustancia nigra (Carpenter et al., 1981, 1981a) sin conocer hasta el momento el tipo de neurotransmisor involucrado.

Vías nigrales eferentes.

Las proyecciones eferentes de la sustancia nigra más ampliamente estudiadas son las fibras nigroestriatales, que se distribuyen principalmente hacia todas las regiones del núcleo estriado (Carpenter y Peter, 1972; Szabo, 1980, 1980a), aunque se reportan algunas vías descendentes hacia el núcleo dorsal del rafe (Beckstead et al., 1979). A través de diferentes estudios se ha podido determinar que estas vías nigroestriatales surgen de la porción compacta de la sustancia nigra y que son de naturaleza dopaminérgica (Anden et al., 1964; Moore et al., 1971; Ungerstedt, 1971), sin embargo, existe controversia para determinar cual es la acción postsináptica de este transmisor ya que se han reportado efectos excitatorios (Kita et al., 1976; Wilson et al., 1982), así como inhibitorios (Connor, 1970; Gonzalez-Vegas, 1974). No obstante, se ha postulado que el efecto de la dopamina depende de su concentración y del tipo de receptor dopaminérgico que active, pues las neuronas estriatales presenta receptores de tipo D1 y D2 (Calabresi, 1987; Akaike, 1987).

El resto de las vías eferentes de la sustancia nigra constituyen una parte importante de los sistemas de salida de información del núcleo estriado. Estas fibras, surgen todas de la región reticulata de la sustancia nigra y comprenden a las fibras nigrotalámicas, nigrotectales y nigrotegmentales, siendo los dos primeros grupos de naturaleza gabaérgica (Vincent et al., 1978; Di Chiara et al., 1979; MacLeod et al., 1980).

Las fibras nigrotalámicas proyectan a las regiones ventral y medial del tálamo (Carpenter y Peter, 1972) e influyen en los patrones de disparo de las neuronas tálamo corticales (Kultas-Ilinsky et al., 1983).

Las terminales de las fibras nigrotectales, proyectan a la región del colículo superior (Rinvik et al., 1976; Graybiel, 1978) y se ha sugerido que pueden estar involucradas con respuestas visuales y auditivas relacionadas con el comportamiento de orientación, cambios de atención, fijación de la atención y respuestas de recepción (Hikosaka y Wurtz, 1983, 1983a, 1983b).

Finalmente, aún cuando se ha identificado que algunas fibras nigrotegmentales tienen sus terminales en el núcleo pedúnculo pontino, el papel funcional de este último no ha podido ser aclarado (Carpenter, et al., 1981), e incluso se ha postulado que dicha innervación es difusa (Childs y Gale, 1983). (Ver fig. 2).

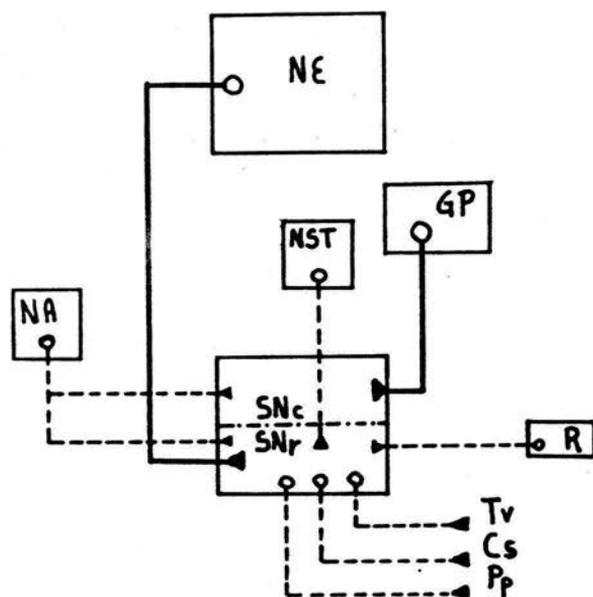


Figura 2. Esquema que muestra las relaciones sinápticas más importantes de la sustancia nigra. Los símbolos neuronales con línea continua representan un 90 % de las aferencias gabaérgicas nigrales. Los símbolos neuronales con línea punteada representan aferencias y eferencias que contienen neurotransmisores de diferente naturaleza. NE, núcleo estriado; GP, globo pálido; NST, núcleo subtalámico; NA, núcleo accumbens; SNc, sustancia nigra compacta; SNr, sustancia nigra reticulata; R, rafé; Tv, tálamo ventromedial; Cs, colículo superior; Pp, núcleo pedúnculo pontino.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Como se comentó anteriormente en la introducción de este trabajo, aún cuando ya se han identificado y caracterizado a los receptores presinápticos de terminales nerviosas noradrenérgicas, colinérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas, para el caso del ácido gamma-aminobutírico existen todavía una serie de controversias para explicar satisfactoriamente el mecanismo de regulación de su liberación por autorreceptores. Por ejemplo, los autorreceptores para GABA en la corteza cerebral de la rata han sido reportados como un sistema de sensibilidad alta (Brennan et al., 1981), de sensibilidad moderada (Mitchell y Martin, 1978) y ausentes (Arbilla et al., 1979) al probar el mismo agonista gabaérgico (muscimol); además, utilizando este mismo agonista, el grupo de Arbilla (1979) reportó un efecto claramente inhibitorio en la sustancia nigra.

Por otra parte, la activación de receptores presinápticos en terminales gabaérgicas mediante la administración individual de antagonistas de GABA, presenta a su vez algunas discrepancias. Tal es el caso del efecto inhibitorio de la bicuculina en la liberación de GABA tritiado inducida por estimulación con alto potasio en rebanadas nigrales reportado por Arbilla y cols. (1979) que se confronta con el trabajo previo de Johnston y Mitchell (1971) cuyos resultados muestran una facilitación de la liberación de GABA por este antagonista en

rebanadas corticales. Simultáneamente, estos autores reportan una inhibición en la liberación de este aminoácido por picrotoxina que se contrapone al nulo efecto que presenta en rebanadas de sustancia nigra mostrado por el grupo de Arbilla (1979). Además, se ha reportado que la bicuculina y picrotoxina no ejercen efecto alguno en sinaptosomas (Brennan et al., 1981).

Además de que la presencia de autorreceptores en diversos sistemas de neurotransmisores es generalmente aceptado, existe acuerdo en cuanto a su caracterización farmacológica en tipos y subtipos de receptores. De esta manera, los autorreceptores noradrenérgicos pertenecen al subtipo adrenoceptor alpha-2 (Langer, 1981; Starke, 1981); los autorreceptores de serotonina se han clasificado como 5-HT_{1B} (Engel et al., 1986; Maura et al., 1986) y los autorreceptores de acetilcolina son muscarínicos y pertenecen aparentemente al subtipo M2 (Marchi y Raiteri, 1985; Mash y Potter, 1986).

En contraste con lo anterior, los autorreceptores de GABA no han sido lo suficientemente estudiados para poder determinar su clasificación en subtipos. Si estas estructura de membrana estan relacionadas con un sistema de retroalimentación negativa para la modulación por la liberación de GABA, es factible pensar que la activación de los autorreceptores es, en condiciones normales, por el GABA mismo y que este debería usarse como el mejor agonista gabaérgico; sin embargo, además de los problemas de intercambio entre el 3H-GABA utilizado para la valoración de la

liberación, y el GABA utilizado como agonista modulador, realizado por un sistema de intercambio altamente eficiente mediado por acarreadores (Levi y Raiteri, 1974), se ha reportado la posible existencia de subtipos de autorreceptores gabaérgicos en diferentes zonas del sistema nervioso central que, si bien son activados por GABA exógeno produciendo un clásico efecto inhibitorio de su liberación, han presentado diferentes comportamientos al utilizar muscimol como agonista (Bowery et al., 1984).

Como es evidente, el número de trabajos reportados sobre la modulación de la liberación del ácido gamma-aminobutírico por receptores presinápticos es más bien reducido pudiendo notar además, la variedad de condiciones experimentales empleadas para explorar este proceso.

Una de las consideraciones más importantes, estriba en que varios de los tejidos empleados en estos estudios presentan una innervación heterogénea abundante, incluyendo la presencia de cuerpos interneuronales y aunque esto puede ser solucionado utilizando tetrodotoxina para bloquear la actividad de este tipo de neuronas, así como con el empleo de preparaciones sinaptosomales, se presenta el inconveniente de analizar de manera parcial el sistema sináptico sin considerar la posible participación de productos postsinápticos en los procesos de liberación del neurotransmisor. Además, entre los tejidos estudiados, se presenta una variabilidad en cuanto a la

dependencia de la liberación por la concentración de calcio extracelular, pues se debe tener en consideración que esta característica es un requisito para la demostración de que los receptores presinápticos modulan la liberación del transmisor (Arbilla et al., 1979).

Por otra parte, aún cuando el empleo de la sustancia nigra satisface la característica de dependencia al calcio en el proceso de liberación, los estudios de regulación presináptica en este tejido no han considerado que se encuentra constituido por la región compacta y la región reticulata las cuales, como se comentó anteriormente, reciben aferencias gabaérgicas de diferentes núcleos y aparentemente presentan un comportamiento diferente en la modulación de la liberación de GABA (Florán et al., 1988).

MATERIALES Y METODOS.

Preparación.

Para la obtención de rebanadas de sustancia nigra, se utilizaron ratas Wistar macho de 250-300 gramos de peso. Una vez sacrificadas por dislocación cervical, las ratas se decapitaron procediendo a la obtención del cerebro completo el cual, al separarse de la cavidad craneal, se colocó en una solución de Krebs-Hanselein a 4 grados centígrados. Basándose en el atlas estereotáxico de Koning y Klippel (1970), del tejido cerebral se obtuvo un bloque en el cual quedara incluida la sustancia nigra y se fijó a un soporte metálico que se introdujo en un vibratomo (Oxford, modelo B), que contenía solución Krebs-Hanselein a 4 grados centígrados, obteniendo rebanadas de tejido de 300 micras de espesor por cortes sucesivos en el plano frontal.

La rebanada obtenida se montó en un portaobjetos frío realizando la disección del núcleo bajo microscopio estereoscópico con un escalpelo oftálmico. En esta serie de experimentos se utilizaron las regiones compacta o reticulata de la sustancia nigra por separado, dependiendo del tipo de experimento. Las rebanadas obtenidas mediante este procedimiento fueron colocadas en una solución Krebs-Hanselein a 37 grados centígrados para permitir su equilibrio. Después de 30 minutos, la solución se reemplazó con una que contenía 2×10^{-8} M de 3H-GABA (65 Ci/mmol, Amersham) y en presencia de beta-alanina (10 μ M)

para bloquear la captura de GABA por las células gliales durante otro periodo de 30 minutos. A continuación, las rebanadas se lavaron con solución Krebs limpia para desechar el exceso de marca radioactiva y fueron transferidas al interior de un sistema de cámaras de perfusión continua (Aceves y Cuello, 1981). (Ver figura 3).

Procedimiento Experimental.

El sistema de perfusión de ocho cámaras en paralelo consiste de los siguientes elementos:

1) Una bomba peristáltica (Cole Parmer), que impulsa las soluciones hacia las cámaras de perfusión, a través de tubos de polietileno de pequeño calibre conectados a la entrada y salida de las cámaras de perfusión.

2) Un sistema regulador de temperatura, que mantiene a 37 grados centígrados la temperatura de las soluciones que se van a perfundir a través de las cámaras.

3) Cámara de perfusión. Cada una de estas esta formada por una cámara externa cilíndrica con un orificio interior que permite la entrada del medio de perfusión, una cámara interna con un tunel estrecho (2.2 mm de diámetro y 10 mm de longitud con una capacidad de 400 μ l.) donde se coloca el tejido a perfundir y que se cierra con tapones de plástico previa colocación de redes finas para impedir la pérdida de tejido por el flujo del líquido de perfusión. Los tapones de plástico presentan una oradación

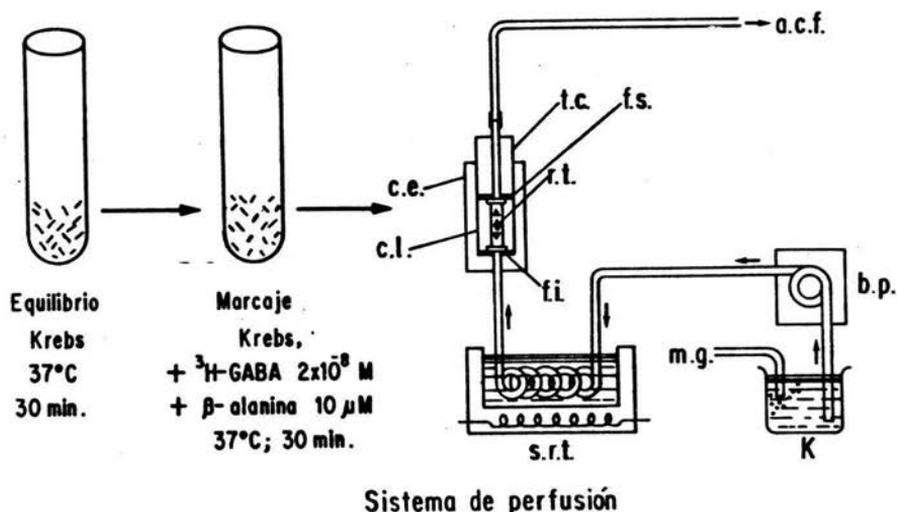


Figura 3. Representación esquemática que muestra el procedimiento experimental al que fueron sometidas las rebanadas de sustancia nigra. Sistema de perfusión: r.t. rebanadas de tejido; f.s. filtro superior; f.i. filtro inferior; c.i. cámara interior; c.e. cámara exterior; t.c. tapón de la cámara; K solución Krebs; m.g. mezcla gaseosa; b.p. bomba peristáltica; s.r.t. sistema regulador de temperatura; a.c.f. al colector de fracciones.

para permitir la salida de la solución y al colocarse sobre las cámaras, se sellaron con grasa de silicona.

4) Un colector de fracciones (LKB 2070 ultrorac II) que recoge el líquido de perfusión en tubos de ensayo cada cuatro minutos.

La velocidad de perfusión a la que fueron sometidas las rebanadas fue de 0.5 ml por minuto y las fracciones fueron colectadas cada cuatro minutos. Las rebanadas se colocaron en las cámaras de perfusión en número de cuatro rebanadas de sustancia nigra compacta o tres rebanadas de sustancia nigra reticulata (4 y 10 mg de peso húmedo, respectivamente) de manera al azar. En estas condiciones, los tejidos permanecieron durante una hora en perfusión con una solución Krebs-Hanselein la cual contenía ácido nípeçótico 10^{-5} M para evitar la recaptura de GABA.

Transcurrido este periodo, se tomaron cuatro muestras de cuatro minutos por cada cámara para evaluar la liberación espontánea del neurotransmisor. A partir de ese momento, las rebanadas fueron perfundidas durante 80 minutos con una solución Krebs-Hanselein que contenía 15 mM de potasio (aproximadamente tres veces más que el control) para evocar la liberación de GABA por depolarización de las terminales gabaérgicas. En esta última solución, se mantiene el producto $(K)(Cl)$ constante con respecto a la solución control, con la finalidad de evitar alteraciones osmóticas en los sistemas sinápticos del tejido. Durante la perfusión con alto potasio se tomaron cuatro fracciones,

aplicándose en seguida a cuatro de las ocho cámaras de perfusión un pulso de agonista o antagonista en presencia de alto potasio, que se mantuvo durante ocho fracciones al final de las cuales, se suspendió el efecto de las drogas volviendo a la perfusión con solución de alto potasio exclusivamente. De esta manera, se pudo contar en cada experimento con cuatro cámaras con muestras control y cuatro con muestras experimentales.

Al final del periodo de estimulación con alto potasio, el tejido fué recuperado de cada una de las cámaras de perfusión y transferido a viales separados donde se les extrajo la radioactividad remanente con 0.5 ml de solubilizador de tejido NCS (Amersham). A estas muestras y a cada una de las fracciones colectadas, las que también fueron transferidas a viales, se les mezcló con 10 ml de líquido de centelleo tipo tolueno. La radioactividad se cuantificó en un espectrometro de centelleo líquido (Packard-Tricarb 2425).

Manejo de Resultados.

El eflujo de la radioactividad durante la colección de cada fracción de cuatro minutos, fue expresada como el fractional rate (F. R.) de estimulación, es decir, la radioactividad colectada en la fracción dividida entre la cantidad total de radioactividad presente en el tejido al inicio del periodo de colección correspondiente:

$$\text{F. R. de Estimulación} = \frac{\text{Radioactividad de la muestra de estimulación}}{\text{Radioactividad del tejido}}$$

El incremento en el F.R. inducido por alto potasio fué calculado mediante la sustracción del F.R. del eflujo basal:

$$\text{F. R. basal} = \frac{\text{Radioactividad de la muestra no estimulada o basal}}{\text{Radioactividad del tejido}}$$

del F.R. de la fracción colectada cada cuatro minutos durante la estimulación continua con alto potasio:

$$\text{Incremento de F.R.} = \text{F.R.}_{\text{estimulación}} - \text{F.R.}_{\text{basal}}$$

que significa la fracción de liberación inducida por alto potasio.

El efecto de las drogas, fué expresado como la fracción promedio del incremento en el F.R. en rebanadas experimentales con respecto al incremento en el F.R. de rebanadas control corridas en paralelo (F.R. RATIO).

$$\text{F.R. ratio} = \frac{\text{Incremento en F.R. experimental}}{\text{Incremento en F.R. control}} \approx 1$$

Si la liberación se facilita el F.R. Ratio será mayor de 1 o menor de 1 en caso de una inhibición.

Analisis estadístico.

En el manejo de los datos se utilizó la prueba de T-Wilcoxon para datos pareados. Esta prueba no paramétrica permitió el analisis del rango de oscilación de un valor experimental con respecto de un valor teórico esperado. Los valores experimentales se expresan como el valor promedio +/- el error estándar del promedio.

Soluciones.

La composición de la solución Krebs-Hanselein fue (mM):

NaCl	134.0
KCl	5.0
CaCl	2.0
² MgSO	1.0
⁴ KH PO	1.25
^{2 4} NaHCO	25.0
³ Glucosa	10.0

ácido amino-oxiacético 0.01

La solución fue equilibrada en carbógeno (CO al 5 %, O al 95 %) y mantenida a una temperatura de 36 C. Después del equilibrio, el pH fue de 7.4.

El medio depolarizante contenia 15 mM de K⁺ y el producto (K) (Cl) fue mantenido constante con respecto al medio normal, disminuyendo la concentración de Cl⁻ y sustituyéndolo con SO₄²⁻ que fue proporcionado como Na SO₄. La osmolaridad fue compensada

con sacarosa. La concentración final depolarizante fue (mM):

NaCl	55.58
Na SO _{2 4}	39.21
K SO _{2 4}	6.87
KH PO _{2 4}	1.25
CaCl ₂	2.0
MgSO ₄	1.0
Glucosa	10.0
ácido amino-oxiacético	0.01

El medio normal y el de alto K⁺, contenían ácido nípecótico (10 µM) durante todo el tiempo de perfusión. El 3H-GABA, con una actividad específica de 65 Ci/mmol, se obtuvo del centro radioquímico Amersham. Las drogas utilizadas se obtuvieron de la compañía Sigma y fueron las siguientes: muscimol, bicuculina, beta-alanina, ácido nípecótico, picrotoxina y baclofén.

El líquido de centelleo contenía por litro de solución:

Tolueno	667.0 ml.
Triton X-100	333.0 ml.
PPO (*)	4.0 g.
POPOP (**)	200.0 mg.

(*) 2,5-Diphenyloxazole.

(**) 1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzeno.

RESULTADOS.

1. Liberación de ³H-GABA en la SNC y en la SNr.

Utilizando el método descrito, en esta serie de experimentos control, se evalúa la magnitud de la liberación de GABA inducida por una solución de alto potasio de manera comparativa entre la sustancia nigra compacta y la sustancia nigra reticulata.

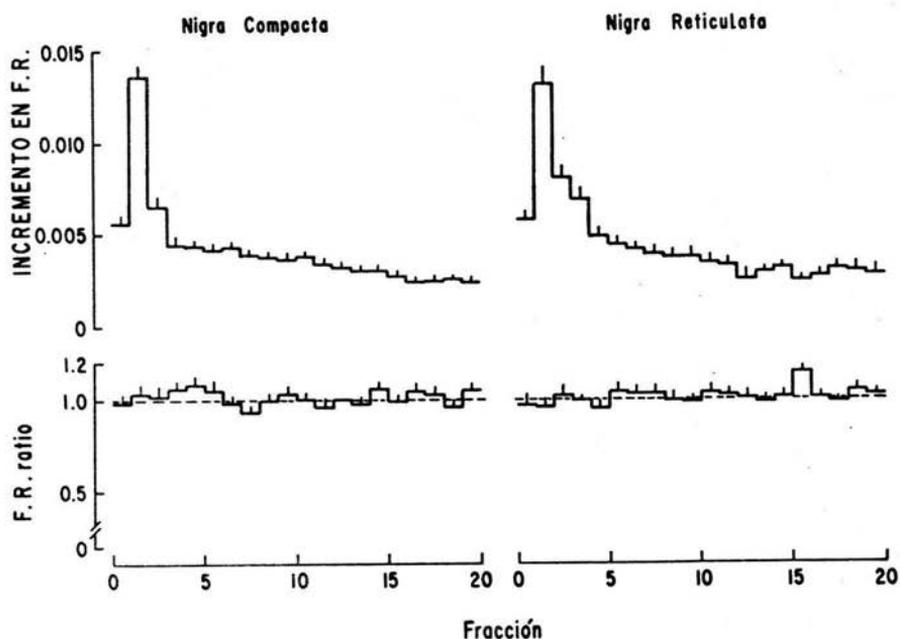
La gráfica 1 muestra el resultado de los experimentos (n=13 para cada región de la sustancia nigra). La parte superior de la gráfica representa el curso temporal de las fracciones de liberación del GABA tritiado, inducida por un pulso continuo de 15 mM de K⁺.

Nótese la similitud de las gráficas en cuanto a magnitud y forma de liberación, tanto para la SNC como para la SNr.

Se puede observar claramente que al principio existe un incremento significativo en la liberación del ³H-GABA que paulatinamente se va reduciendo pero que se mantiene por arriba de la liberación basal durante todo el tiempo de estimulación con alto potasio.

En la parte inferior se ha graficado la razón en el incremento de la fracción de liberación del grupo experimental con respecto al grupo control, tomando pares de valores al azar de sus respectivas fracciones de liberación.

Se puede observar que el valor, tanto para la SNC como para la SNr, se mantiene oscilando alrededor de uno a lo largo de todo



Gráfica 1. Liberación de 3H-GABA en rebanadas de sustancia nigra compacta y reticulata inducida por estimulación con una solución de alto potasio (15 mM) aplicada continuamente durante la colección de 20 fracciones de 4 min. cada una. La parte superior representa el curso temporal de la liberación del 3H-GABA expresada como el incremento en la fracción de la liberación. En la parte inferior se muestra la razón en el incremento de la fracción de liberación del grupo experimental con respecto al grupo control, tomando pares de valores al azar de sus respectivas fracciones de liberación. Los valores representan el promedio \pm el error estándar de 13 experimentos para cada región de la sustancia nigra.

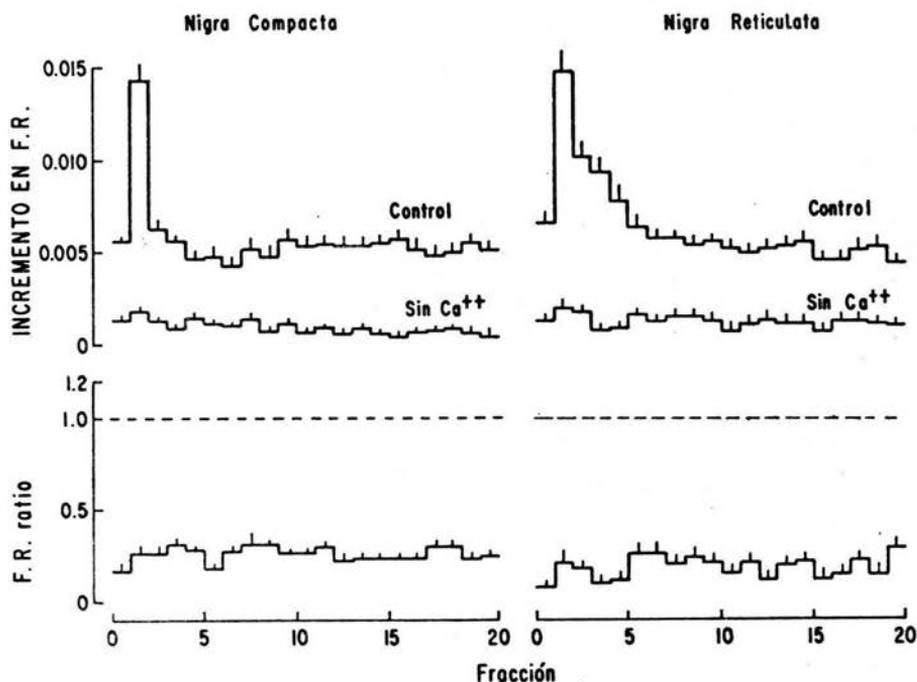
el experimento, lo cual nos indica que la razón en la liberación del GABA radioactivo no difiere apreciablemente en rebanadas superfundidas en paralelo.

El cambio experimental de esta relación constante, servirá para caracterizar los efectos producidos por los diferentes agonistas y anatagonistas gabaérgicos en la liberación del ³H-GABA.

2. Dependencia de Ca⁺⁺ en la liberación de ³H-GABA en la SNc y en la SNr.

Para estudiar la modulación de la liberación de un neurotransmisor por receptores presinápticos, es necesario mostrar que el sistema de liberación es dependiente de Ca⁺⁺ (Langer, 1981), por lo que una vez que se analizò el comportamiento de la liberación producida por estimulación del ³H-GABA en los experimentos anteriores, se procedió a determinar si dicho proceso era dependiente de calcio, para lo cual se substituyó equimolarmente el Ca⁺⁺ por Mg⁺⁺ en el medio de perfusión, con una concentración final de CaCl₂ = 0.0 mM y de MgCl₂ = 3 mM.

La gráfica 2 muestra el resultado de ocho experimentos para cada región de la sustancia nigra en donde se observa que el proceso es marcadamente dependiente de calcio, y que al omitirlo del medio de superfusión se produce una reducción de aproximadamente un 80 % en la liberación inducida tanto en la



Gráfica 2. Dependencia al calcio de la liberación de 3H-GABA en la sustancia nigra compacta y en la sustancia nigra reticulata. Se puede apreciar que el proceso de liberación es marcadamente dependiente al calcio pues, al omitirlo del medio de perfusión (sustitución equimolar con magnesio) durante la colección de 20 fracciones, se produce una reducción en la liberación de 3H-GABA en ambas regiones de la sustancia nigra. Nótese el cambio en el F.R. ratio que indica una inhibición de la liberación en los grupos experimentales. Los valores representan el promedio +/- el error estándar de 8 experimentos para cada región de la sustancia nigra.

sustancia nigra compacta como en la reticulata ($p > 0.01$). Nótese el cambio en el F.R. ratio que indica una inhibición de la liberación en el grupo experimental.

3. Efecto del muscimol (agonista gabaérgico para receptores tipo "A") en la liberación de ³H-GABA en la SNC y en la SNr.

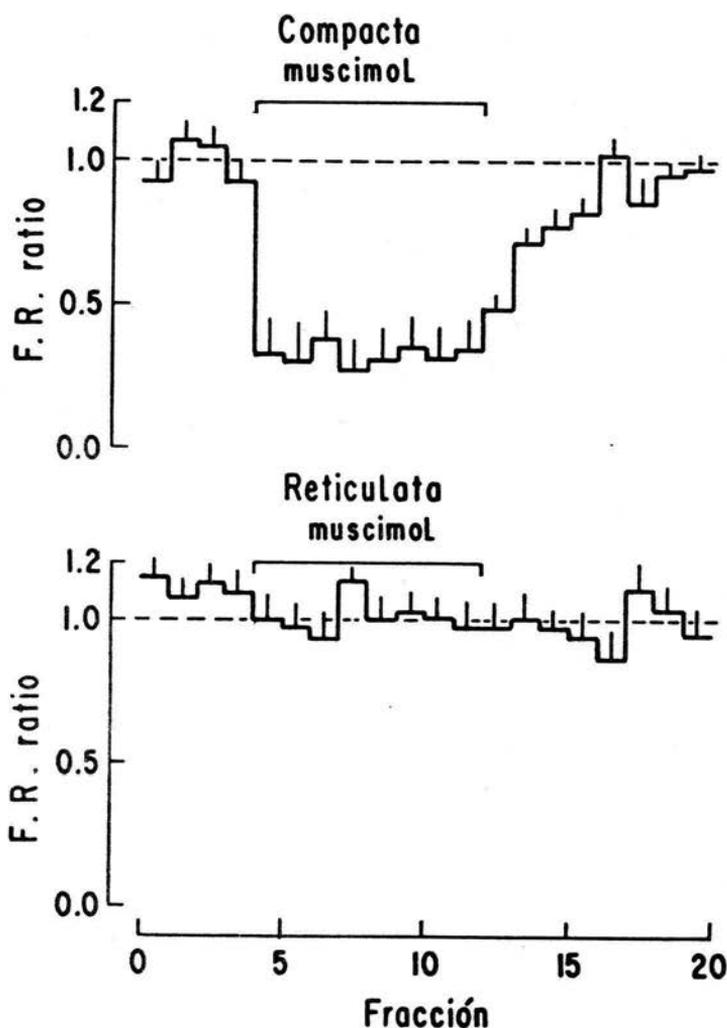
En esta serie de experimentos se observó el efecto de la aplicación de un pulso de muscimol ($1 \mu\text{M}$) sobre la liberación espontánea y estimulada por K del ³H-GABA en las dos regiones de la sustancia nigra.

La gráfica 3 nos muestra el resultado de ocho experimentos para cada región de la SN en donde la superfusión con el agonista se mantuvo durante 32 minutos.

Nótese que la acción del muscimol se ejerce sobre la sustancia nigra compacta, produciendo una inhibición en la liberación inducida del ³H-GABA de aproximadamente un 60 % ($p > 0.001$), mientras que en la sustancia nigra reticulata, parece no tener efecto alguno (t-Wilcoxon. N.S.).

El efecto inhibitorio total se observó en la fracción inmediata posterior al momento de iniciar la superfusión con la solución que contenía el muscimol.

Se puede observar que al momento de suspender el pulso de muscimol, se inicia una recuperación gradual de la inhibición volviendo casi a sus valores iniciales a los 12 minutos.



Gráfica 3. Efecto del muscimol en la liberación de ^3H -GABA en la SNC y la SNr. Nótese que la acción del muscimol se ejerce en la SNC y no en la SNr. Se puede observar además que al momento de suspender el pulso de muscimol, se inicia una recuperación gradual de la inhibición. $N = 8$ para cada región de la sustancia nigra. Los valores representan el promedio \pm el error estándar.

4. Efecto del baclofèn (agonista gabaèrgico para receptores tipo "B") en la liberaci3n de H-GABA en la SNC y en la SNr.

En estos experimentos se observ3 el efecto de la aplicaci3n de un pulso de baclofèn (100 µM) en las dos regiones de la sustancia nigra.

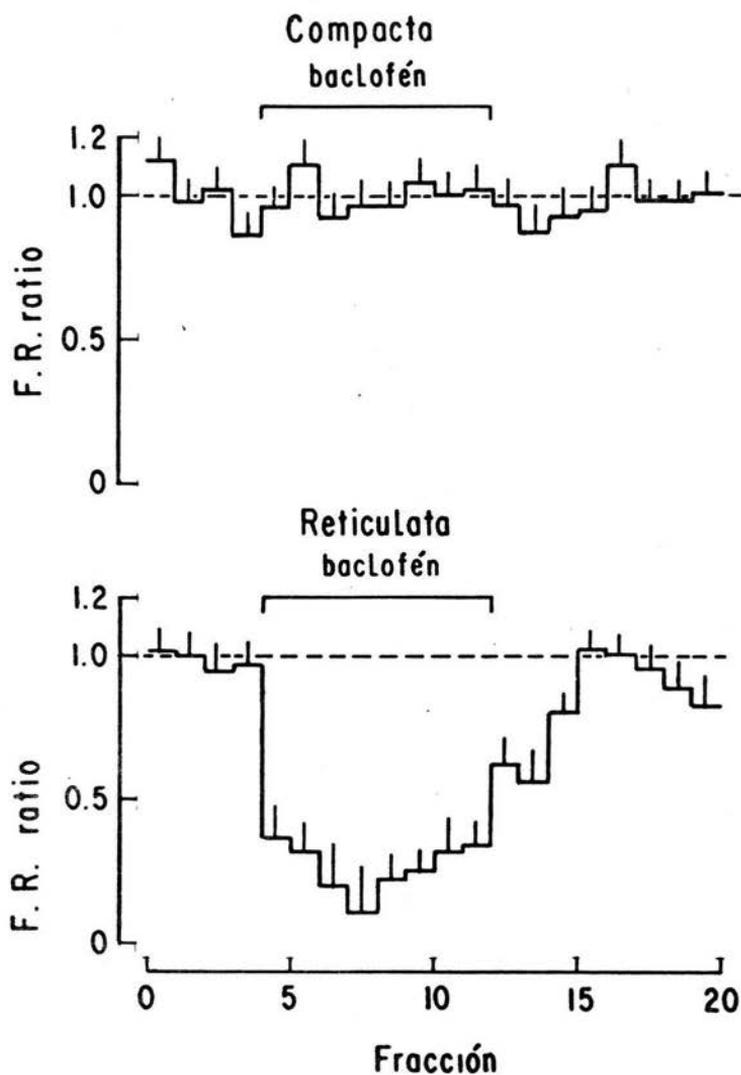
La gràfica 4 nos muestra el resultado de ocho experimentos para cada regi3n de la SN en donde se mantuvo un pulso de baclofèn durante 32 minutos.

Se puede observar que, en contraste al efecto mostrado por muscimol, la acci3n del baclofèn se ejerce en la SNr ($p > 0.001$, t-Wilcoxon), pues la liberaci3n se ve inhibida aproximadamente en un 65 %, mientras que no parece haber efecto alguno en la regi3n compacta (t-Wilcoxon N.S.).

Al aplicar el baclofèn, su efecto inhibitorio se observ3 inmediatamente; sin embargo, al momento de suprimir la droga del lquido de perfusi3n, se nota una recuperaci3n mäs lenta que no llega a alcanzar sus valores iniciales.

5. Efecto de la bicuculina (Antagonista gabaèrgico para receptores tipo "A") en la liberaci3n de H-GABA en la SNC y en la SNr.

En esta serie de experimentos se valor3 el efecto de la bicuculina (10 µM) de manera comparativa en las dos regiones de la sustancia nigra, basándose en los datos reportados por Arbilla y Langer (1979) y para tratar de diferenciar la posibilidad de



Gráfica 4. Efecto del baclofén en la liberación del 3H-GABA en la SNC y la SNr. Se puede observar que la acción del baclofén se ejerce en la SNr y no en la SNC. La recuperación en la liberación de 3H-GABA en la SNr al suspender el pulso de baclofén es más lenta que la mostrada por la SNC al retirar el muscimol. Los valores representan el promedio de 8 experimentos +/- el error estándar para cada región de la sustancia nigra.

una modulación por GABA endógeno.

La grafica 5 muestra el resultado de ocho experimentos para cada región de la sustancia nigra a la aplicación del antagonista que duró 32 minutos.

Nótese que la bicuculina facilitó la liberación de ³H-GABA inducida por alto potasio en la sustancia nigra compacta, pero fué inhibida en la región reticulata.

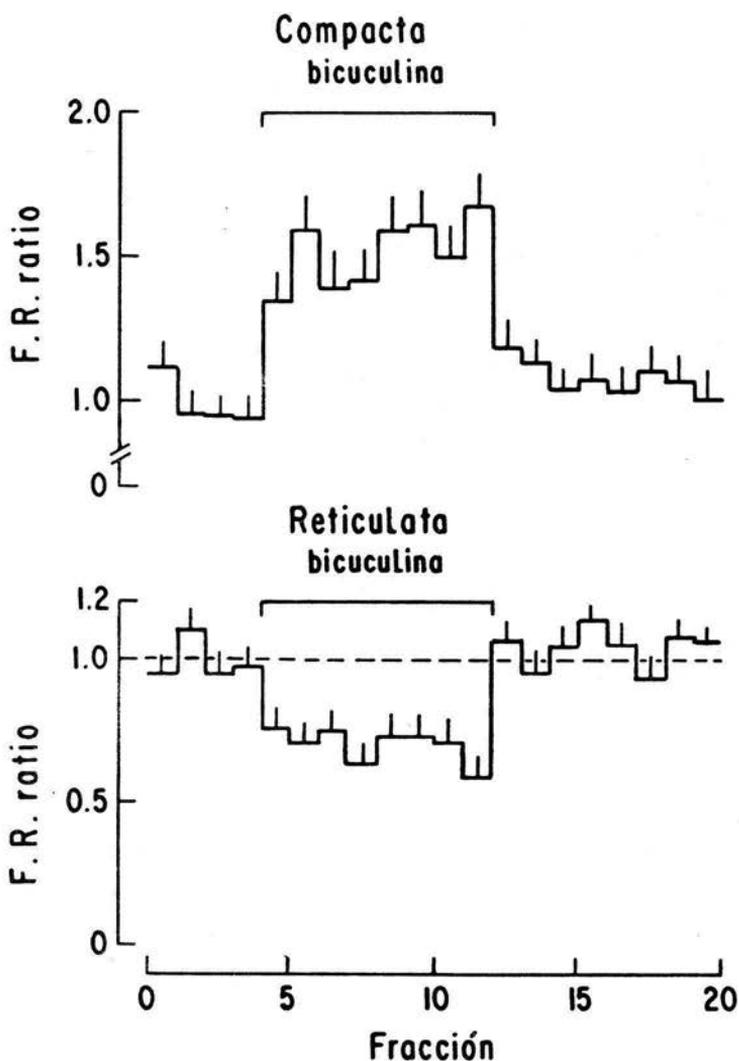
En la SNC, la liberación inducida por alto K⁺ fué facilitada aproximadamente en un 40 % ($p > 0.05$, t-Wilcoxon).

En la SNr, la inhibición de la liberación inducida por K⁺ fué de aproximadamente un 30 % ($p > 0.05$, t-Wilcoxon).

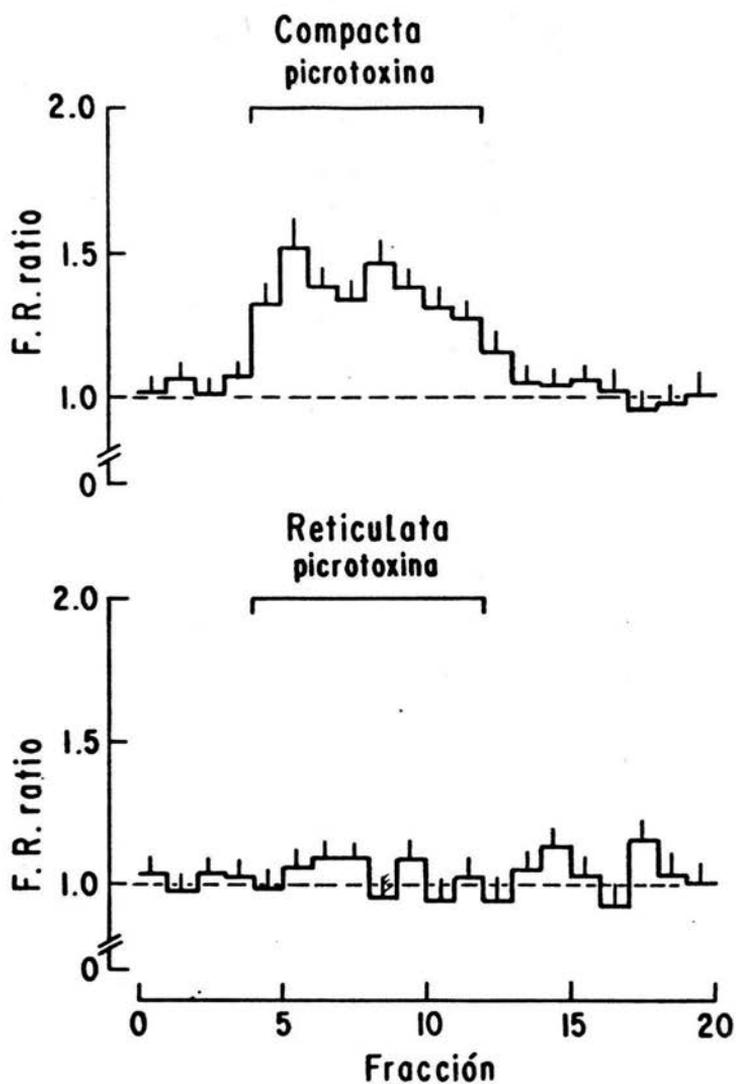
6. Efecto de la picrotoxina (antagonista gabaérgico para ³ receptores tipo "A") en la liberación de ³H-GABA en la SNC y en la SNr.

En estos experimentos se analizó el efecto de la picrotoxina (10 μ M) en la liberación del GABA tritiado en ambas regiones de la sustancia nigra.

La gráfica 6 muestra el resultado de 4 experimentos para cada región de la sustancia nigra, de la aplicación de un pulso del antagonista con 32 minutos de duración. Puede observarse que ³ la picrotoxina facilita la liberación de ³H-GABA inducida por alto potasio en la sustancia nigra compacta, pero no muestra ningún efecto en la región reticulata. La facilitación de la liberación fué de aproximadamente 35 % ($p > 0.05$, t-Wilcoxon).



Gráfica 5. Efecto de la bicuculina en la liberación del 3H-GABA en la SNC y la SNr. Nótese que la bicuculina produjo una facilitación en la SNC y una inhibición en la SNr de la liberación de 3H-GABA inducida por alto potasio. Los valores representan el promedio de 8 experimentos \pm el error estándar para cada región de la sustancia nigra.



Gráfica 6. Efecto de la picrotoxina en la liberación de 3H-GABA en la SNC y la SNr. Se puede observar que la picrotoxina facilita la liberación de 3H-GABA inducida por alto potasio en la sustancia nigra compacta pero no en la reticulata. Los valores representan el promedio de 4 experimentos \pm el error estándar para cada región de la sustancia nigra.

DISCUSION DE RESULTADOS.

Dado que se han reportado diferencias anatómicas (Rinvik y Grofová, 1970; Bak et al., 1975; Juraska et al., 1975; Hattori et al., 1975; Araki, 1985), electrofisiológicas (Deniau et al., 1978), neuroquímicas (Dahlstron y Fuxe, 1964; Okada et al., 1971; Diffligia et al., 1982; Weber et al., 1982) y conductuales (Schultz, 1980, 1984; Schultz, et al., 1983) entre la sustancia nigra compacta y la sustancia nigra reticulata, hemos intentado establecer una diferencia adicional basándonos en el efecto de agonistas y antagonistas gabaérgicos en la liberación de 3H-GABA inducida por una solución de alto potasio (15 mM) en rebanadas de cada región de la sustancia nigra. Con base en la caracterización farmacológica de agonistas y antagonistas para los dos tipos de receptores gabaérgicos hasta ahora descritos y apoyándonos en otros estudios donde se ha utilizado al muscimol y al baclofén como agonistas que presentan selectividad para diferenciar la presencia de receptores gabaérgicos tipo "A" o tipo "B" en el sistema nervioso central (Anderson y Mitchell, 1985), nuestros resultados experimentales sugieren que puede existir una diferencia en la modulación de la liberación de 3H-GABA en las dos regiones de la sustancia nigra, ya que al aplicar muscimol (agonista para receptores gabaérgicos tipo "A") a la sustancia nigra compacta se observa una inhibición en la liberación de 3H-GABA inducida por potasio, no así al aplicarlo en la sustancia

nigra reticulata, por lo cual proponemos que la liberación en la SNc parece estar siendo modulada por autorreceptores gabaérgicos de una manera similar a como lo hacen este tipo de receptores en otros sistemas. Asimismo, nuestros resultados nos sugieren que el receptor gabaérgico que esta modulando la liberación del 3H-GABA en la SNc es de tipo "A" y que en la SNr este tipo de receptores no estan presentes ya que el muscimol no presentò efecto alguno.

Sin embargo, en la sustancia nigra reticulata el baclofén (agonista gabaérgico para receptores tipo "B") inhibió la liberación de GABA de manera significativa. Este hallazgo, además de confirmar la diferencia inicialmente propuesta, relacionada con una diferente modulación de la liberación de 3H-GABA en ambas regiones de la sustancia nigra, sugieren que pueden existir autorreceptores de tipo "B", complejos que ya han sido sugeridos por Mitchell y Martin (1978); no obstante, este hallazgo también puede ser explicado en esta porción de la sustancia nigra por un efecto indirecto a través de un heterorreceptor.

Actualmente, se tienen evidencias de que la liberación de dopamina en el núcleo estriado es modulada inhibitoriamente por receptores tipo "B" (Bowery et al., 1980a) y se ha reportado también que las dendritas de las células dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta liberan dopamina hacia la SN reticulata (Cheramy et al., 1981). Por otra parte se ha sugerido que la liberación de GABA en la SNr parece ser modulada por receptores dopaminérgicos D1 facilitando la liberación de ese

neurotransmisor (Nava-Asbell et al., 1988).

Considerando lo anterior y suponiendo la existencia de un receptor tipo "B" en las dendritas de las células dopaminérgicas que module la liberación de dopamina, la aplicación de baclofén inhibirá la liberación de dopamina endógena en el sistema y originará una desestimulación del receptor dopaminérgico que modula la liberación de GABA, dando la impresión de que es el baclofén el que origina esta inhibición. Para poder determinar con seguridad estos efectos, se hacen necesarios estudios posteriores que analicen la liberación dopaminérgica dendrítica en la SNr.

Al aplicar bicuculina y picrotoxina (antagonistas gabaérgicos para receptores tipo "A"), en la sustancia nigra compacta se observa una facilitación de la liberación del 3H-GABA, lo cual concuerda con las observaciones hechas acerca del efecto de los antagonistas sobre el funcionamiento en otros autorreceptores por sus antagonistas correspondientes, asimismo, nos sugiere que la acción de los antagonistas se realiza bloqueando la activación del receptor por GABA endógeno evocada durante la estimulación. Sin embargo, la falta hasta el momento, de un antagonista específico para los autorreceptores gabaérgicos tipo "B", nos ha impedido analizar si en la SNr el efecto del baclofén es susceptible de ser antagonizado y si existe una modulación tónica por GABA endógeno.

Cuando se aplica bicuculina en la sustancia nigra reticulata

encontramos un efecto inhibitorio en la liberación del 3H-GABA; sin embargo, al aplicar picrotoxina en esa misma región, no se modifica la liberación del GABA tritiado. Debido a este comportamiento, la bicuculina parece mostrar un efecto similar al de un antagonista gabaérgico, considerando que puede estar influyendo en la SNr a través de autorreceptores o heterorreceptores.

La discrepancia acerca del comportamiento de la bicuculina ya había sido reportada por Arbilla y colaboradores (1979) al aplicarla en toda la sustancia nigra, atribuyéndoselo a una diferencia farmacológica entre los receptores presinápticos y los postsinápticos para GABA. No obstante, dado que la picrotoxina ejerce el efecto esperado sobre los autorreceptores gabaérgicos de la sustancia nigra compacta y no en la reticulata, sugiere que el efecto de la bicuculina no es sobre un autorreceptor de otro tipo; además, esto coincide con la sugerencia hecha por Barker y su grupo (1983) en el sentido de que estos antagonistas pueden actuar en forma diferente a nivel del receptor gabaérgico. Estos resultados también sugieren que los receptores involucrados en la modulación de la liberación del 3H-GABA en la sustancia nigra reticulata son de tipo "B".

CONCLUSIONES.

Bajo las condiciones experimentales en que se desarrollaron los experimentos de la modulación en la liberación de GABA por autorreceptores gabaérgicos, se establecen la siguientes conclusiones:

1) No existe diferencia significativa en la magnitud y la liberación de 3H-GABA entre la SNC y la SNr inducida por alto potasio.

2) Tanto en la SNC como en la SNr, el mecanismo de liberación es dependiente de calcio.

3) Se sugiere la existencia de receptores gabaérgicos presinápticos de tipo "A" (probablemente autorreceptores) sobre las terminales de la sustancia nigra compacta y de tipo "B" (que pueden ser auto o heterorreceptores) sobre las terminales gabaérgicas en la sustancia nigra reticulata.

4) El efecto facilitatorio de la liberación mostrado por los antagonistas gabaérgicos en la sustancia nigra compacta, sugiere la activación del autorreceptor por GABA endógeno, el cual, por un mecanismo de retroalimentación inhibe la liberación de GABA mismo.

5) La bicuculina presentó un efecto no característico en la liberación de GABA en la SNr, mostrando un efecto similar al de un agonista que pudiera estar influenciando el mecanismo de liberación a través de auto o heterorreceptores.

6) Con base a la diferente aferencia sináptica de la sustancia nigra, los receptores tipo "A" se localizan en terminales provenientes del globo pálido y de SNr, en tanto que los receptores tipo "B" se encuentran en terminales estriatales.

APENDICE.

A) Justificación del uso de rebanadas.

Al examinar los eventos que suceden durante el proceso de la modulación de la liberación de neurotransmisores en las terminales axónicas del sistema nervioso central, se ha considerado que, de manera definitiva, esta actividad fisiológica depende de la actividad en el soma de la neurona; por lo tanto, la mayoría de los estudios en este campo se han efectuado in vitro, utilizando la preparación de rebanadas de tejido (Starke, 1979; Mulder, 1982) en donde es posible, con adecuadas condiciones de manejo, mantener el sistema sináptico terminal libre del efecto de los cuerpos celulares.

Las rebanadas de tejido cerebral son finas capas con menos de 0.5 mm de grosos y ha sido bien caracterizadas en relación a sus propiedades metabólicas, biosintéticas, de transporte y electrofisiológicas. Se ha demostrado que es factible mantener estas funciones durante varias horas bajo una incubación in vitro, dentro de un medio salino balanceado suplementado con glucosa y oxígeno (Orrego, 1979). Este tipo de preparaciones tiene además un considerable valor como herramientas farmacológicas en el estudio de los efectos fisiológicos de neurotransmisores y drogas en el sistema nervioso central.

Con respecto a las alteraciones del tejido durante la preparación de rebanadas de tejido cerebral, se ha reportado que

estas se hinchan durante su incubación in vitro (Pappius et al., 1962); sin embargo, mediciones de rebanadas de diferentes grosores, muestran que aquellas que tienen un grosor mayor de 0.35 mm presentan dos capas externas de tejido lesionado, midiendo cada una entre 0.15 y 0.17 mm y una zona central de tejido intacto (Cohen, 1974). Posteriormente, se ha encontrado que la captura de varios aminoácidos no era marcadamente diferente en rebanadas de corteza cerebral 0.1 a 0.42 mm de grosor, exceptuando al glutamato, aspartato y GABA que muestran una acumulación mayor en rebanadas delgadas (0.1 mm) como lo muestra el trabajo de Sershen y Lajtha (1974). Aunque las observaciones de estos autores sugieren que para una mayor captura de GABA deberían utilizarse rebanadas de 0.1 mm de espesor, en los experimentos de esta tesis decidimos utilizar rebanadas de 0.3 mm para garantizar una porción suficiente de tejido intacto y una alta captura.

B) Justificación de la técnica.

En vista de que la adaptación realizada por Frankhuysen y Mulder (1982) a la técnica de dosis respuesta al utilizar una depolarización continua con alto potasio (20 mM) en la caracterización de receptores presinápticos involucrados en la modulación de la liberación de noradrenalina tritiada en rebanadas de hipocampo, resultó ser similar al empleo de una estimulación repetitiva con alto potasio en cuanto a su

dependencia al calcio y a que la radioactividad liberada constituyó mas del 90 % de la 3H-noradrenalina no metabolizada, decidimos implementar esta técnica para determinar la presencia de receptores gabaérgicos que pudieran estar jugando un papel en la modulación de la liberación de 3H-GABA en las dos porciones de la sustancia nigra, donde ya se ha demostrado una clara dependencia al calcio en este proceso (Bargas, 1982). Consideramos además, que el 3H-GABA liberado constituyó aproximadamente un 80 % del 3H-GABA no metabolizado ya que al quitar el calcio del medio de perfusión se vi  inhibida su liberación alrededor de ese porcentaje.

Por otra parte, bajo las condiciones experimentales de la técnica de superfusión, es factible que la mayor parte del neurotransmisor liberado por el tejido sea rápidamente removido lo cual reduce la posibilidad de su recaptura o de su degradación.

Esta técnica permite, además, establecer fácilmente el curso temporal de la liberación.

C) Problemas en la valoración de la liberación de GABA.

En los procesos de captura y de liberación de GABA, existen algunos factores que pueden estar influyendo en la cuantificación de este neurotransmisor. Por lo tanto, a continuación se enumeran los más importantes y la manera en que consideramos ejercimos un control sobre los mismos.

1) Captura glial de GABA.

Se ha sugerido que la recaptura de GABA en las terminales nerviosas del sistema nervioso central pudiera terminar la acción de ese neurotransmisor (Iversen y Johnston, 1971; Ryan y Roskosky, 1977; Hertz, 1979), por lo que en nuestros experimentos, al estar añadiendo 3H-GABA exógeno, existe la posibilidad de que los sistemas de captura de alta afinidad para el GABA descritos en las células gliales (Henn y Hamberger, 1971; Schon y Kelly, 1974) pudieran interferir con los sistemas de captura de las terminales nerviosas (Iversen y Bloom, 1972), influyendo en la cuantificación del GABA liberado.

Para evitar esta competencia glial, se decidió la adición de 1 μ M de beta-alanina a la solución que contenía el 3H-GABA durante los 30 minutos del proceso de marcaje a que se sometieron las células nigrales. El empleo de la beta-alanina se basa en que es un aminoácido con estructura muy similar al ácido gamma-aminobutírico, no bloquea el sistema de captura en las células nerviosas y es un potente inhibidor de la captura de GABA en las células gliales (Schon y Kelly, 1974, 1975).

2) Metabolismo del GABA.

Dado que las concentraciones intra y extracelulares de GABA están reguladas por su síntesis a través de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en las terminales nerviosas gabaérgicas (Fonnum et al., 1970; Fonnum y Walberg, 1973; Sellstrom et al., 1975) y de que su subsecuente catabolismo se realiza a través de

la enzima GABA-transaminasa (GABA-T) (Sellstrom et al., 1975), es importante tratar de asegurar que el 3H-GABA aportado a las rebanadas no sea degradado de manera significativa por la GABA-T. Por tal motivo, utilizamos el ácido aminooxiacético (AAOA) en las soluciones de perfusión durante todo el experimento, considerando que este compuesto ha sido descrito como un débil inhibidor de la captura de GABA, pero que tiene la capacidad de actuar como un inhibidor competitivo de la enzima GABA-T, impidiendo que el GABA sea degradado sin interferir en su captura o liberación (Snodgrass e Iversen, 1973; Johnston y Balcar, 1974; Krogsgaard-Larsen et al., 1975).

3) Recaptura del GABA.

Es posible que los sistemas de captura de alta afinidad presentes en las terminales nerviosas (Iversen y Bloom, 1972) puedan recapturar el 3H-GABA liberado al estimular con alto potasio, provocando que la medición de la radioactividad no sea la correcta. Por lo tanto, para evitar la recaptura del 3H-GABA, se utilizó el ácido nipecótico (ácido piperidin-2-carboxílico) durante la perfusión, ya que se ha descrito como un potente inhibidor no competitivo de la captura de GABA (Beart y Johnston, 1973) tanto neuronal como glial y que no interfiere con la liberación del GABA (Beart et al., 1972).

4) Mecanismos de homointercambio de GABA.

No es factible descartar en nuestros experimentos, la presencia de mecanismos de intercambio de 3H-GABA por GABA

endógeno por los sistemas de captura de alta afinidad presentes en las terminales gabaérgicas (Levi y Raiteri, 1974; Raiteri et al., 1975) durante el periodo de 30 minutos en el marcaje de las rebanadas; sin embargo, puesto que el 3H-GABA se acumuló en el tejido de manera significativa y es liberado paulatinamente al someterlo a una solución de alto potasio, es posible que a partir de ese momento no ocurra un intercambio. Si acaso los procesos de homointercambio se vieran activados al estimular el tejido con alto potasio e incrementar la concentración de GABA en el líquido de perfusión a que es sometido, consideramos que el proceso de perfusión mismo evita la acumulación de 3H-GABA fuera de las rebanadas haciendo menos probable la activación de dichos procesos.

BIBLIOGRAFIA.

- ✓ Aceves, J. y Cuello, A. (1981). Dopamine release induced by electrical stimulation of microdissected caudate-putamen and substantia nigra of the rat brain. *Neuroscience*. 6: 2060-2075.
- ✓ Akaike, A., Yukihiro, O., Masashi, S. y Shuji, T. (1987). Excitatory and inhibitory effects of dopamine on neuronal activity of the caudate nucleus neurons in vitro. *Brain Res.* 418: 262-272.
- Anden, N.E., Carlsson, A., Dahlstrom, A., Fuxe, K., Hillary, N.A. y Larsson, K. (1964). Demonstration and mapping out of nigrostriatal neurons. *Life Sci.* 3: 523-530.
- Anderson, R. y Mitchell, R. (1985). Effects of GABA receptors agonists on (3H)-dopamine release from median eminence and pituitary neurointermediate lobe. *Europ. J. of Pharmacol.* 115: 109-112.
- ✓ Araki, M., McGeer, P.L. y McGeer, E.G. (1985). Striatonigral and pallidonigral pathways studied by a combination of retrograde horseradish peroxidase tracing and pharmacohistochemical method for gamma-aminobutyric transaminase. *Brain Res.* 331: 17-24.
- Arbilla, S.L., Kamal, L.A. y Langer, S.Z. (1979). Presynaptic GABA autoreceptors on gabaergic nerve endings of the rat substantia nigra. *Eur. J. Pharmacol.*

57: 211-217.

- ✓ Bak, I.J., Choi, W.B., Hassler, R., Usonoff, K.G. y Wagner, A. (1975). Fine structural synaptic organization of the corpus striatum and substantia nigra in the rat and cat. En *Dopaminergic Mechanisms* (eds. Calne, D., Chase, T.N. and Barbeau, A.). Raven Press, New York.
- Bargas, J. (1982). Estudio comparativo de la liberación de 3H-GABA en los núcleos caudoputamen, substancia negra y globo pálido del cerebro de rata. Tesis de Maestría. Departamento de Fisiología y Biofísica. CINVESTAV-IPN.
- Barker, J.L., Mc Burney, R.N. y Mathers, D.A. (1983). Convulsant-induced depression of aminoacid responses in mouse culture spinal neurones studied under voltage clamp. *Br. J. Pharmacol.* 80: 619-629.
- Beart, P.M. y Johnston, G.A.R. (1973). GABA uptake in rat brain slices: inhibition by GABA analogues and by various drugs. *J. Neurochem.* 20: 319-324.
- Beart, P.M., Johnston, G.A.R. y Uhr, M.L. (1972). Competitive inhibition of GABA uptake in rat brain slices by some GABA analogues of restricted conformation. *J. Neurochem.* 19: 1855-1861.
- ✓ Beckstead, R.M., Domesick, V.B. y Nauta, W.J.H. (1979). Efferents connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res.* 175: 191-217.

- Bowery, N.G. (1983) Classification of GABA receptors. En The GABA Receptors (ed. Enna S.J.) 177-213. The Humana Press, New Jersey.
- Bowery, N.G., Hill, D.R., Hudson, A.L., Doble, A., Middlemiss, D.N., Shaw, J., y Turnbull, M.J. (1980). (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. Nature. 283:92-94.
- Bowery, N.G., Doble, A., Hill, D.R., Hudson, A.L., y Turnbull, M.J. (1980a). GABA facilitates or inhibits the evoked release 3H-noradrenaline from rat cerebellar cortex slices by an action at separate receptors. Br. J. Pharmacol. 70: 77P.
- Brennan, M.J.W. y Cantrill, R.C. (1979). The effect of delta- aminolaevulinic acid on the uptake and efflux of (3H)-GABA in rat brain synaptosomes. J. Neurochem. 32: 1781-1786.
- Brennan, M.J.W. y Cantrill, R.C. (1979a). The effect of delta-aminolaevulinic acid on the uptake and efflux of aminoacids neurotransmitters in rat brain synaptosomes. J. Neurochem. 33: 721-725.
- Brennan, M.J.W., Cantrill, R.C., Oldfield, M. and Krogsgaard-Larsen, P. (1981). Inhibition of gamma-aminobutyric acid release by gamma-aminobutyric acid agonists drugs: pharmacology of the gamma-aminobutyric

- acid autoreceptor. *Mol. Pharmacol.* 19: 27-30.
- Bunney, B.S. y Aghajanian, G.K. (1976). The precise localization of nigral afferents in the rat as determined by a retrograde tracing technique. *Brain Res.* 117: 423-435.
- ✓ Calabresi, P., Mercury, N. Stanzione, A.S. y Bernardi, G. (1987). Intracellular studies on the dopamine induced firing inhibition of neostriatal neurons in vitro: Evidence for D1 receptor involvement. *Neurosci.* 20: 757-771.
- Carpenter, M.B. (1984). Interconnections between the corpus striatum and brain stem nuclei. En *Advances in Behavioral Biology. The Basal Ganglia* (ed. McKenzie, J., Kerm, R.E., Wilcox, L.N.) Plenum Press.
- Carpenter, M.B. y Peter, P. (1972). Nigrostriatal and nigrothalamic fibers in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 144: 93-116.
- Carpenter, M.B., Batton, R.R., Carleton, S.C. y Keller, J.T. (1981). Interconnections and organization of pallidal and subthalamic nucleus neurons in the monkey. *J. Comp. Neurol.* 197: 579-603.
- Carpenter, M.B., Carleton, S.C., Keller, J.T. y Conte, P. (1981a). Connections of the subthalamic nucleus in the monkey. *Brain Res.* 224:1-29.
- Carter, D.A. y Fibiger, H.C. (1978). The projections of the

entopeduncular nucleus and globus pallidus in rat as demonstrated by autoradiography and horseradish peroxidase histochemistry. *J. Comp. Neurol.* 117: 113-124.

✓ Cheramy, A., Leviel, V. y Glowinski, J. (1981). Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature.* 289: 537-542.

Chesselet, M.-F. (1984). Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: facts and hypothesis. *Nuroscience.* 12 (2): 347-375.

Childs, J. y Gale, K. (1983). Neurochemical evidence for a nigrosegmental gabaergic projection. *Brain Res.* 258: 109-114.

Cohen, S.R. (1974). The dependence of water content and "extracellular" marker spaces of incubated mouse brain slices on thickness, alterations produced by slicing and fluid spaces in intact and altered tissue. *Expl. Brain Res.* 20: 435-457.

✓ Connor, J.D. (1970). Caudate nucleus neurones: correlation of the effects of substantia nigra stimulation with iontophoretic dopamine. *J. Physiol. (Lond).* 208: 691-703.

Cunnane, T.C. y Stjarne, L. (1982). Secretion of transmitter from individual varicosities of guinea-pig and mouse vas deferens: all or none and extremely intermitent.

- Neuroscience. 7: 2565-2576.
- Cunnane, T.C. y Stjarne, L. (1984). Frequency dependent intermitency and ionic basis of impulse conduction in postganglionic sympathetic fibers of guinea-pig vas deferens. Neuroscience. 11:211-229.
- Curtis, D.R., Duggan, A., Felix, D. y Johnston, G.A.R. (1971). Bicuculline: an antagonist of GABA and synaptic inhibition in the spinal cord of the cat. Brain Res. 32: 69-96.
- Dahlstrom, A. y Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. Acta Physiol. Scand. (suppl.) 232: 1-55.
- De Feudis, F.V. (1983). Gamma aminobutyric acid and cardiovascular function. Experientia. 39: 845-849.
- De Langen, C.D.J., Hogenboom, F., y Mulder, A.H. (1979). Presynaptic noradrenergic alpha-receptors and modulation of 3-H-noradrenaline release from rat brain synaptosomes. Eur. J. Pharmacol. 60: 79-89.
- Deniau, J.M., Hammond, C., Rizk, A. y Feger, J. (1978). Electrophysiological properties of identified output neurons of the rat substantia nigra (pars compacta and pars reticulata): evidences for the existence of branched neurons. Exp. Brain Res. 32: 409-422.

- Deniau, J.M., Kitai, S.T., Donoghve, J.P. y Grofovà, I. (1982). Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. *Exp. Brain Res.* 47: 105-113.
- Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S. y Beaudet, A. (1982). The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: A light and electron microscope radioautographic study. *J. Comp. Neurol.* 207: 239-254.
- Di Chiara, G., Porceddu, M.L., Morelli, M., Mulas, M.L. y Gessa, G.L. (1979). Evidence for gabaergic projection from the substantia nigra to ventromedial thalamus and the superior colliculus of the rat. *Brain Res.* 176: 273-284.
- DiFligia, M., Aronin, N. y Martin, J.B. (1982). Light and electron microscopic localization of immunoreactive Leuenkephaline in the monkey basal ganglia. *J. Neurosci.* 2: 303-320.
- Dismukes, R.K. y Mulder, A.H. (1976). Cyclic AMP and alpha-receptor-mediated modulation of noradrenaline release from rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 39:383-388.
- ✓ Dray, A. (1979). The striatum and substantia nigra: a comentary on their relationships. *Neuroscience.* 4: 1407-1439.
- Dray, A., Gonye, T.J., Oakley, N.R. y Tanner, T. (1976). Evidence for the existence of a raphe projection to the

- substantia nigra in rat. *Brain Res.* 113: 45-57.
- Engel, G., Gothert, M., Hoyer, D., Schlicker, E. y Hillenbrand, K. (1986). Identity of inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine (5-HT) autoreceptors in the rat brain cortex with 5-HT binding sites. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 332: 1-7.
- Enna, S.J. (1981). Neuropharmacological and clinical aspects of gamma-aminobutyric acid (GABA). En *Neuropharmacology of Central Nervous System and Behavioral Disorders* (ed. Palmer, G.). 507-537. Academic Press, New York.
- Enna, S.J. (1983). GABA receptors. En *The GABA Receptors* (ed. Enna, S.J.) 1-23. The Humana Press, New Jersey.
- Enna, S.J. y Gallagher, J.P. (1983). Biochemical and electrophysiological characteristics of mammalian GABA receptors. *Int. Rev. Neurobiol.* 24: 181-212.
- Floràn, B., Silva, I., Nava, C. y Aceves, J. (1988). Presynaptic modulation of the release of GABA by GABA "A" receptors in pars compacta and by GABA "B" receptors in pars reticulata of the rat substantia nigra. *Eur. J. Pharmacol.* 150: 277-286.
- Fonnum, F. y Walberg, F. (1973). An estimation of the concentration of gamma-aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in inhibitory Purkinje axon terminals in the cat. *Brain Res.* 54: 115-127.
- Fonnum, F., Storm-Mathisen, J. y Walberg, F. (1970).

Glutamate descarboxylase in inhibitory neurons. A study of the enzyme in Purkinje cells axons and boutons in the cat. *Brain Res.* 20: 259-275.

Fonnum, F., Grofova, I., Rinvik, E., Storm-Mathisen, J. y Walberg, F. (1974). Origin and distribution of glutamate descarboxylase in substantia nigra of the cat. *Brain Res.* 71: 77-92.

Fonnum, F., Gottesfeld, Z. y Grofova, I. (1978). Distribution of glutamate descarboxylase, choline acetyltransferase and aromatic amino acid descarboxylase in the basal ganglia of normal and operated rats. Evidences for striatopallidal, striatopeduncular and striatonigral gabaergic fibers. *Brain Res.* 143: 125-138.

Frankhuysen, A.L. y Mulder, A.M. (1982). A cumulative dose response technique for the characterization of presynaptic receptors modulating (3H)-noradrenaline release from rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 78: 91-97.

Frankhuysen A.L. y Mulder, A.M. (1982a). Pharmacological characterization of presynaptic alpha-adrenoceptors modulating (3H)-noradrenaline and (3H)-5-hydroxytryptamine release from slices of the hippocampus of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 81: 97-106.

Gahwiler, B.H. y Brown, D.A. (1985). GABA B receptor

- activated K⁺ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 1558-1562.
- Gale, K. y Casu, M. (1981). Dynamic utilization of GABA in substantia nigra: regulation by dopamine and GABA in the striatum, and its clinical and behavioral implications. Mol. Cell. Biochem. 39: 369-405.
- Gallagher, J.P. y Shinnick-Gallagher, P. (1983). Electrophysiological characteristics of GABA-receptor complexes. En The GABA Receptors (ed. Enna S.J.) 25-61 The Humana Press, New Jersey.
- ✓ Gonzales-Vegas, J.A. (1974). Antagonism of dopamine-mediated inhibition in the nigrostriatal pathway: a mode of action of some catatonia-inducing drugs. Brain Res. 80: 219-228.
- Gray, R. y Johnston, D. (1985). Rectification of single GABA-gated chloride channels in adult hippocampal neurons. J. Neurophysiol. 54: 134-142.
- Graybiel, A.M. (1978). Organization of the nigrotectal projection: an experimental tracer study in the cat. Brain Res. 143: 339-348.
- Grofovà, I. y Rinvik, E. (1970). An experimental electron microscopy study on the striatonigral projection in the cat. Exp. Brain Res. 11: 249-262.
- Groves, P.M. (1983). A theory of functional organization of

- the neostriatum and the neostriatal control of voluntary movement. *Brain Res. Rev.* 5: 109-132.
- Hammond, C. y Yelnik, J. (1983). Intracellular labeling of rat subthalamic neurones with horseradish peroxidase: computer analysis of dendrites and ccharacterization of axon arborization. *Neurosci.* 8: 781-790.
- Hattori, T., Fibiger, H.C. y McGeer, P.L. (1975). Demonstration a pallidonigral projection inervating dopaminergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 162: 487-504.
- Henn, F.A. y Hamberger, A. (1971). A glial cell functions: uptake of transmitter substances. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68: 2686-2690.
- Hertz, L. (1979). Functional interactions between neurons and astrocytes. I Turnover and metabolism of putative aminoacid transmitters. *Prog. Neurobiol.* 13: 277-323.
- Hikosaka, O. y Wurtz, R.H. (1983). Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata I. Relation of visual and auditory responses to saccades. *J. Neurophysiol.* 49: 1230-1253.
- Hikosaka, O. y Wurtz, R.H. (1983a). Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata II. Visual responses related to fixation of gaze. *J. Neurophysiol.* 49: 1254-1267.
- Hikosaka, O. y Wurtz, R.H. (1983b). Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata.

- J. Neurophysiol. 49: 1268-1284.
- Hill, D.R. y Bowery, N.G. (1981) 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA sites in rat brain. Nature. 290: 149-152.
- Iversen, L.L. (1984). Aminoacids and peptides: fast and slow chemical signals in the nervous system ? Proc. R. Soc. Lond. B 221: 245-260.
- Iversen, L.L. y Bloom, F.E. (1972). Studies of the uptake of 3H-GABA and 3H-glycine in slices and homogenates of rat brain and spinal cord by electron microscopic autoradiography. Brain Res. 41: 131-143.
- Iversen, L.L. y Johnston, G.A.R. (1971). GABA uptake in rat central nervous system: comparison of uptake in slices and homogenates and the effects of some inhibitors. J. Neurochem. 18: 1939-1950.
- Iversen, L.L., Rogawski, M.A., and Miller. (1976). Comparison of the effects of neuroleptic drugs on pre and postsynaptic dopaminergic mechanisms in the rat striatum. Mol. Pharmacol. 12: 251-257.
- Johnston, G.A.R. y Balcar, V.J. (1974). Amino-oxyacetic acid: a relatively non specific inhibitor of uptake of aminoacids and amines by brain and spinal cord. J. Neurochem. 22: 609-610.
- Johnston, G.A.R. y Mitchell, J.F. (1971). The effect of bicuculline, metrazol, picrotoxine and strychnine on

- the release of 3H-GABA from rat brain slices. *J. Neurochem.* 18: 2441-2446.
- Johnston, G.A.R., Beart, P.M., Curtis, D.R., Game, C.J.A., McCulloch, R.M. y Maclachlan. (1972). Bicuculline metachloride as a GABA antagonist. *Nature (New Biol.)*. 240: 219-220.
- Juraska, J.A., Wilson, C.J. y Groves, P.M. (1977). The substantia nigra of the rat: A Golgy study. *J. Comp. Neurol.* 172: 585-600.
- Kanazawa, I., Marshall, G.R. y Kelly, J.S. (1976). Afferents to the rat substantia nigra studied with horseradish peroxidase, with special reference to fibres from the subthalamic nucleus. *Brain Res.* 115: 485-491.
- Katz, B. y Miledi, R. (1969). Tetrodotoxin resistant electric activity in presynaptic terminals. *J. Physiol., Lond.* 203: 459-487.
- Kemp, J. (1970). The termination of striopallidal and strionigral fibers. *Brain Res.* 17: 125-128.
- Kerr, D.I.B., Ong, J., Prager, R.H., Gynther, B.D. y Curtis, D.R. (1986). Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. *Brain Res.* 405: 150-154.
- Kim, J.S., Bak, I.J. y Okada, Y. (1971). Role of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system: some evidence for the existence of a type of GABA rich striato-nigral neurons. *Exp. Brain Res.* 14:

95-104.

Kim, R., Nakano, K., Jayaraman, A. y Carpenter, M.B. (1976). Projections 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. y Wood, J. (1976). Origin and characteristics of the cortico-caudate afferents: An anatomical and electrophysiological study. *Brain Res.* 118: 137-141.

Koning, J.F. y Klippel, R.A. (1970). *The rat brain: a stereotaxic atlas.* (ed. Krieger, R.E.) Huntington Press, New York.

Krnjevic, K. (1974). Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.* 54: 418-540.

Krogsgaard-Larsen, P., Johnston, G.A.R., Curtis, D.R., Game, C.J.A. y McCulloch, R.M. (1975). Structure and biological activity of a series of conformationally restricted analogues of GABA. *J. Neurochem.* 25: 803-809.

Kuhar, M.J., Aghajanian, G.K. y Roth, R.H. (1972). Tryptophan hydroxylase activity and sinaptosomal uptake of serotonin in discrete brain regions after midbrain raphe lesions: correlations with serotonin levels and histochemical fluorescence. *Brain Res.* 44: 165-176.

Kultas-Ilinsky, K., Illinsky, I., Warton, S. y Smith, K.R.

- (1983). Fine structure of nigral and pallidal afferents in the thalamus: An EM autoradiographic study in the cat. *J. Comp. Neurol.* 216: 390-405.
- Langer, S.Z. (1977). Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. *Br. J. Pharmacol.* 60: 481-497.
- Langer, S.Z. (1980). Presynaptic regulation of the release of catecholamines, *Pharmacol. Rev.* 32: 337-362.
- Levi, G. y Raiteri, M. (1974). Exchange of neurotransmitter amino acid at nerve endings can stimulate high affinity uptake. *Nature.* 250: 735-736.
- MacLeod, N.K., James, T.A., Kilpatrick, I.C. y Starr, M.S. (1980). Evidence for a gabaergic nigrothalamic pathway in the rat. *Exp. Brain Res.* 40: 55-61.
- Marchi, M. y Raiteri, M. (1985). On the presence in the cerebral cortex of muscarinic receptor subtypes which differ in neural localization, function and pharmacological properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235: 230-236.
- Mash, D.C. y Potter, L.T. (1986). Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neurosci.* 19: 551-564.
- Maura, G., Roccatagliata, E. y Raiteri, M. (1986). Serotonin autorreceptor in rat hippocampus: pharmacological characterization as a subtype of the 5-HT₁ receptor.

- Naunyn-Schmiedeberg. Arch. Pharmacol. 334: 323-326.
- Mitchell, P.R. y Martin, I.L. (1978). Is GABA release modulated by presynaptic receptors? Nature. 274: 904-905.
- Moore, R.Y., Bhatnagar, R.K. y Heller, A. (1971). Anatomical and chemical studies of a nigro-neostriatal projections in the cat. Brain Res. 30: 119-135.
- Morselli, P.L. y Lloyd, K.G. (1983). Clinical Pharmacology of GABA agonists. En The GABA Receptors (ed. Enna, S.J.) 305-336. The Humana Press, New Jersey.
- Muhyaddin, M., Roberts, P.J. y Woodruff, G.N. (1982). Presynaptic gamma-aminobutyric acid receptors in the rat annococcygeus muscle and their antagonism by 5-aminovaleric acid. Br. J. Pharmacol. 77: 163-168.
- Mulder, A.H. (1982). An overview of subcellular localization, release and termination of action of amine, amino acid and peptide neurotransmitters in the central nervous system. Prog. Brain Res. 55: 135-156.
- Nava-Asbell, C., Florán, B., Arias-Montaffo, A., Martínez-Fong, D. y Aceves, J. (1988). Modulación de la liberación de GABA en la pars reticulata de la sustancia nigra por dopamina endógena. XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Querétaro, Gro.
- Nauta, H.J.W., Smith, G.P., Faull, R.L.M. y Domesick, V.B. (1978). Efferent connections and nigral afferents to

- the nucleus accumbens septi in the rat. *Neurosci.* 3: 385-401.
- Nistri, A. y Constanti, A. (1979). Pharmacological characterization of different types of GABA and glutamate receptors in vertebrates and invertebrates. *Prog. Neurobiol.* 13: 117-235.
- Olsen, R.W. (1981). GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. *J. Neurochem.* 37: 1-9.
- Orrego, F. (1979). Criteria for identification of central neurotransmitters and their applications to studies with some nerve tissue preparations in vitro. *Neurosci.* 4: 1037-1057.
- Pappius, H.M., Klatzko, I. y Elliot, A.C. (1962). Further studies on swelling of brain slices. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40: 885-898.
- Raiteri, M., Federico, R., Coletti, A. y Levi, G. (1975). Release and exchange studies relating to the synaptosomal uptake of GABA. *J. Neurochem.* 24: 1243-1250.
- Ribak, C.E., Vaughn, J.E. y Roberts, E. (1980). Gabaergic nerve terminals decrease in the substantia nigra following hemitranssections of the striatonigral and pallidonigral pathways. *Brain Res.* 192: 413-420.
- Rinvik, E. (1966). The corticonigral projections in the cat: An experimental study with silver impregnation methods.

- J. Comp. Neurol. 126: 241-254.
- Rinvik, E. y Grofová, I. (1970). Observations on the fine structure of the substantia nigra in the cat. Exp. Brain Res. 11: 229-248.
- Rinvik, E., Grofová, I. y Ottersen, O.P. (1976). Demonstration of nigrotectal and nigroreticular projections in the cat by axonal transport of protein. Brain Res. 112: 388-394.
- Rinvik, E. y Walberg, F. (1969). Is there a cortico-nigral tract? A comment based on experimental electron microscopic observations in the cat. Brain Res. 14: 742-744.
- Ryan, L.D. y Roskosky, R. (1977). New uptake of gamma-aminobutyric acid by a high affinity synaptosomal transport system. J. Pharmac. Exp. Theor. 200: 285-291.
- Ryan, L.D., Tepper, J.M., Sawyer, S.F., Young, S.J., y Groves, P.M. (1985). Autoreceptor activation in central monoamine neurons: modulation of neurotransmitter release is not mediated by intermittent axonal conduction. Neuroscience. 15: 925-931.
- Schon, F. y Kelly, J.S. (1974). The characterisation of 3H-GABA uptake into the satellite glial cells of rat sensory ganglia. Brain Res. 66: 289-300.
- Schon, F. y Kelly, J.S. (1975). Selective uptake of 3H-beta-alanine by glia: association with the glia uptake

- systems for GABA. *Brain Res.* 86: 243-257.
- Schultz, W., Reffieux, A. y Rebischer, P. (1983). The activity of pars compacta neurons of the monkey substantia nigra in relation to motor activation. *Exp. Brain Res.* 51: 377-387.
- Schwyn, R.C. y Fox, C.A. (1974). The primate substantia nigra: A Golgi and electron microscopic study. *J. Hirnforsch.* 15: 95-126.
- Segal, M. y Barker, J.L. (1984). Rat hippocampal neurons in culture: properties of GABA-activated Cl ion conductance. *J. Neurophysiol.* 51: 500-515.
- Sellstrom, A., Sjoberg, L.B. y Hamberger A. (1975). Neuronal systems for gamma-aminobutyric acid metabolism. *J. Neurochem.* 25: 393-398.
- Sershen, H. y Lajtha, A. (1974). The distribution of amino acids, Na⁺ and K⁺ from surface to centre in incubated slices of mouse brain. *J. Neurochem.* 22: 977-985.
- Snodgrass, S.R. e Iversen, L.L. (1973). Effects of amino-oxyacetic acid on 3H-GABA uptake by rat brain slices. *J. Neurochem.* 20: 431-439.
- Sphepherd, G.M. (1979). The synaptic organization of the brain. Cap. 12. second edition. Oxford University Press, N.Y.
- Starke, K. (1979). Presynaptic regulation of release in the central nervous system. En *The Release of*

- Catecholamines from Adrenergic Neurons (ed. Paton, D.M.) 143-183 Pergamon Press, Oxford.
- Starke, K. (1981). Presynaptic receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21: 7-30.
- Stjarne, L. (1978). Facilitation and receptor-mediated regulation of noradrenaline secretion by control of recruitment of varicosities as well as by control of electro-secretory coupling. *Neuroscience.* 3: 1147-1155.
- Swanson, L.W. y Cowan, W.M. (1975). A note on the connections and development of the nucleus accumbens. *Brain Res.* 92: 324-330.
- Szabo, J. (1962). Topical distribution of striatal efferents in the monkey. *Exper. Neurol.* 5: 21-36.
- Szabo, J. (1967). The efferent projections of the putamen in the monkey. *Exper. Neurol.* 19: 463-476.
- ✓ Szabo, J. (1970). Projections from the body of the caudate nucleus in the rhesus monkey. *Exper. Neurol.* 27: 1-15.
- ✓ Szabo, J. (1980). Organization of the ascending striatal afferents in monkey. *J. Comp. Neurol.* 189: 307-321.
- ✓ Szabo, J. (1980a). Distribution of striatal afferents from the mesencephalon in the cat. *Brain Res.* 188: 3-12.
- Szerb, J.C. (1980). Effect of low calcium and of oxotremorine on the kinetics of the evoked release of (3H)-acetylcholine from the guinea-pig myenteric plexus; comparison with morphine. *Naunyn-Schmiedeberg's*

- Arch. Pharmacol. 311: 119-127.
- Szerb, J.C. y Somogyi, G.T. (1973). Depression of acetylcholine release from cerebral cortical slices by cholinesterase inhibition and by oxotremorine. Nature New Biol. 241: 121-123.
- Ungerstedt, U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. Acta Physiol. Scan. (suppl). 367: 1-48.
- Van den Pool, A.N., Smith, A.D. y Powell, J.F. (1985). GABA axons in synaptic contact with dopamine neurons in the substantia nigra: double immunocytochemistry with biotin peroxidase and protein A colloidal gold. Brain Res. 348: 146-154.
- Vincent, S.R., Hattori, T. y McGeer, E.G. (1978). The nigrotectal projection: A biochemical and ultrastructural characterization. Brain Res. 151: 159-164.
- Voneida, T.J. (1960). An experimental study of the course and destination of fibers arising in the head of caudate nucleus in the cat and monkey. J. Comp. Neurol. 115: 75-87.
- Weber, E., Roth, K.A. y Barchas, J.D. (1982). Immunohistochemical distribution of alpha neoeendorphin/dynorphin neuronal systems in rat brain: evidence for localization. Proc. Natl. Aca. Sci. USA

79: 3062-3066.

- Wilkin, G.P., Hudson, A.L., Hill, D.R. y Bowery, N.G. (1981). Autoradiographic localization of GABA B receptors in rat cerebellum. *Nature (Lond.)* 294: 584-585.
- Williams, M. (1983) Anxiolytic anxiolytics. *J. Med. Chem.* 26: 619-622.
- Willow, M. y Johnston, G.A.R. (1983). Pharmacology of barbiturates: electrophysiological and neurochemical studies. *Int. Rev. Neurobiol.* 24: 15-49.
- Wilson, C.J., Chang, H.T. y Kitai, S.T. (1982). Origins of postsynaptic potentials evoked in identified rat neostriatal neurons by stimulation in substantia nigra. *Exp. Brain Res.* 45: 157-162.
- Yarowsky, D.J. y Carpenter, D.L. (1978). A comparison of similar ionic responses to gamma-aminobutyric acid and acetylcholine. *J. Neurophysiol.* 41: 531-541.