

24 01965



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVIDENCIA VOLTAMETRICA DE UNA VIA  
PEDUNCULOPONTINO - NIGRAL QUE MODULA  
LA ACTIVIDAD DE LAS NEURONAS DOPAMI-  
NERGICAS NIGRO - ESTRIATALES

T E S I S

FARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

AREA DE PSICOBIOLOGIA

P R E S E N T A I

SALVADOR LEONARDO HERNANDEZ LOPEZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1990



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

I. INTRODUCCION	
A) JUSTIFICACION.....	1
B) ANTECEDENTES	
1) La substancia nigra.....	2
2) El sistema dopaminérgico nigroestriatal.....	4
3) El núcleo pedunculopontino	
a) Anatomía general.....	6
b) Aferentes del núcleo pedunculopontino.....	7
c) Eferentes del núcleo pedunculopontino.....	11
d) Relación funcional del núcleo pedunculopontino con la corteza y los ganglios basales .....	20
e) Relación con la fisiopatología extrapiramidal .....	22
II. OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	25
III. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
IV. MATERIAL Y METODOS	
A) El método de voltametría.....	30
1) Cronoamperometría.....	31
2) Voltametría de pulso diferencial.....	32
3) Aplicaciones de la voltametría de pulso diferencial.....	33
B) Fabricación de los electrodos.....	35
C) Tratamiento electroquímico de los electrodos.....	36
D) Calibración de los electrodos.....	37
E) Mediciones de DOPAC en el neostriado.....	39
F) Medición de dopamina en el neostriado.....	40
G) Implantación de cánulas.....	42
H) Histología.....	43

I) Drogas.....	44
J) Análisis estadístico.....	44
V. RESULTADOS	
A) Efecto de la fisostigmina aplicada por vía sistémica sobre la concentración de DOPAC en el neocóstriado de la rata anestesiada.....	45
B) Efecto de la fisostigmina aplicada en la substancia nigra sobre la concentración de DOPAC en el neocóstriado.....	46
C) Efecto de la dl-muscarina aplicada en la substancia nigra sobre la concentración de DOPAC en el neocóstriado.....	47
D) Efecto del ácido kaínico aplicado en el núcleo pedunculopontino sobre la concentración de DOPAC en el neocóstriado.....	49
E) Efectos del haloperidol y la gamma-butirolactona administrados sistémicamente sobre la concentración de DOPAC en el neocóstriado.....	50
VI. DISCUSION	
A) Ventajas y limitaciones de la voltametría de pulso diferencial.....	51
B) El DOPAC como índice de la actividad de las neuronas dopaminérgicas.....	53
C) Evidencias de que la acetilcolina endógena puede modular la liberación y el recambio de la dopamina en el neocóstriado.....	55
D) Evidencias de la existencia de una vía colinérgica a la substancia nigra compacta.....	57
E) Evidencias de que la acetilcolina activa receptores muscarínicos M <sub>1</sub> en la substancia nigra.....	58
F) Evidencias de que existe una vía colinérgica pedunculopontino-nigral.....	61
G) Implicaciones fisiológicas.....	63
VII. CONCLUSIONES.....	66
VIII. REFERENCIAS.....	68

## RESUMEN

Recientemente se ha demostrado que en la sustancia nigra (SN) existen terminales inmunoreactivas a la acetiltransferasa de colina. Los estudios morfológicos y electrofisiológicos sugieren que el núcleo pedunculopontino (NPP) es la más importante fuente de inervación colinérgica a la SN. El objetivo de este trabajo fue investigar si las terminales colinérgicas procedentes del NPP están funcionalmente acopladas a las neuronas dopaminérgicas de la SN y si pueden modular el recambio de la dopamina en el neostriado.

Como índice del recambio de la dopamina se midió la concentración del ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) en el neostriado utilizando el método de voltametría de pulso diferencial (Gonon y cols., Nature 266: 702, 1989). Un electrodo de fibra de carbono fue implantado en el neostriado de ratas machos de la cepa Wistar (280-320 g) anestesiadas con hidrato de cloral. Una vez estabilizada la señal de DOPAC (basal = 100 %), los fármacos o el vehículo fueron administrados en la SN o el NPP, a través de una cánula metálica implantada una semana antes.

La administración local de fisostigmina (0.75 µg) en la SN produjo un incremento significativo en la concentración de DOPAC en el neostriado ipsilateral (135 ± 6 %, n = 5). La dl-muscarina (0.5 µg) en la SN también produjo incremento en la concentración de DOPAC y su efecto fue bloqueado con pirenzepina (un antagonista M<sub>1</sub>) y facilitado por el antagonista M<sub>2</sub>, AF DX-116. La estimulación del NPP con kainato (0.5 µg) produjo un gran incremento en la concentración de DOPAC en el neostriado ipsilateral (163 ± 6 %, n = 5). El efecto disminuyó parcialmente con la aplicación de escopolamina (5 mg/Kg, i.p.), un antagonista muscarínico, pero no se modificó con la administración del antagonista nicotínico, mecamilamina.

Estos resultados sugieren la existencia de una vía colinérgica pedunculopontino-nigral cuyas terminales pueden modular la actividad de la vía dopaminérgica nigroestriatal a través de receptores muscarínicos del tipo M<sub>1</sub>.

## I. INTRODUCCION

### A) JUSTIFICACION.

Un gran número de estudios anatómicos han demostrado que la mayoría de los ganglios basales, incluyendo el núcleo caudado, el globo pálido, el núcleo subtalámico y la sustancia *nigra* (SN), tienen conexiones recíprocas con la región locomotora mesencefálica (RLM) (García-Rill, 1986). Esta, se define fisiológicamente como la región del tallo cerebral que al ser estimulada con bajas intensidades de corriente, puede inducir la locomoción coordinada en gatos con sección precolicular-postmamilar. Hay trabajos que sugieren que la RLM es equivalente al núcleo pedunculopontino (NPP), el cual se sabe modula los osciladores de la locomoción espinal.

Los ganglios basales participan en el inicio y el control del movimiento voluntario y el hecho de que tengan conexiones recíprocas con el NPP, sugiere que esta estructura podría estar involucrada en la regulación de las influencias de los ganglios basales sobre el sistema motor inferior. Asimismo, apoya la hipótesis de que las vías aferentes y eferentes del NPP desempeñan un papel crucial en la fisiopatología de los ganglios basales relacionada con los desórdenes del movimiento (García-Rill, 1986).

En este trabajo, el mayor interés se centró en caracterizar farmacológicamente la vía colinérgica pedunculopontino-nigral, ya que esto podría ayudar a interpretar una serie de hallazgos bioquímicos, electrofisiológicos y conductuales relacionados con la transmisión colinérgica en la sustancia *nigra*. Asimismo, nuestros hallazgos podrían contribuir a la comprensión del papel que juega el NPP en las funciones motoras extrapiramidales, un campo de investigación poco explorado.

## B) ANTECEDENTES

### 1) La sustancia *nigra*.

La sustancia *nigra* es un conglomerado celular localizado en el mesencéfalo y que obtiene su nombre debido a que, en los primates, algunas de sus neuronas contienen el pigmento melanina. Este núcleo ha sido subdividido en tres regiones: la *pars compacta*, la *pars reticulata* y la *pars lateralis* (Fallon y Loughlin, 1985). La *pars compacta* está situada dorsomedialmente y contiene los somas de las neuronas dopaminérgicas que proyectan al neocórtex y a la corteza frontal (Fallon, 1985). La *pars reticulata* se sitúa ventrolateralmente, tiene una menor densidad celular y recibe una importante aferencia GABAérgica. La vía

aferente a la *pars reticulata* mas estudiada y documentada es la proyección inhibitoria estriado-nigral, la cual se origina de la neurona espinosa mediana de naturaleza GABAérgica que se encuentra en el neocestriado (Somogyi y Smith, 1979; Bolam y cols., 1981; Nitsch y Riesenberg, 1986). Existe además otra proyección estriado-nigral excitatoria que contiene substancia P y que se origina de células localizadas en la porción rostral del neocestriado (Hagy y cols., 1978a). Es interesante señalar que hacia la *pars reticulata* también se proyectan las dendritas de las células dopaminérgicas de la *pars compacta* (Fallon y Loughlin, 1985), las cuales liberan dopamina y posiblemente modulan la liberación de GABA de las vías aferentes. La *pars reticulata* es una de las principales fuentes de salida de los ganglios basales y proyecta eferentes GABAérgicas al tálamo ventromedial, al colículo superior y la formación reticular (DiChiara y cols., 1979; Beckstead y cols., 1979; Kilpatrick y cols., 1980; MacLeod y cols., 1980). Existen evidencias de que las neuronas GABAérgicas de la *pars reticulata* constituyen la vía efectora del aumento de la actividad motora inducido por la activación de la vía dopaminérgica nigroestriatal (Kilpatrick y cols., 1982; Scheel-Krüger, 1986).

## 2) El sistema dopaminérgico nigroestriatal.

En la rata, la *pars compacta* de cada lado contiene aproximadamente 3500 neuronas dopaminérgicas cuya principal zona de proyección es el neostriado (Andén y cols., 1966). Se ha calculado que estas neuronas establecen aproximadamente  $1.75 \times 10^9$  contactos sinápticos en cada hemisferio cerebral, que dan una idea de la enorme influencia que ejercen estas células sobre las neuronas neostriatales. Hay evidencias morfológicas de que los axones dopaminérgicos hacen sinapsis con las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del neostriado (Freund y cols., 1964). También se sabe que la proyección es principalmente ipsilateral aunque exista además un pequeño componente contralateral (Fass y Butcher, 1961; Loughlin y Fallon, 1962; Fallon, 1966). A pesar de que se han efectuado numerosos estudios para dilucidar el efecto de la dopamina sobre la excitabilidad de las neuronas neostriatales, aún existe controversia acerca de si su efecto es excitatorio o inhibitorio. La mayoría de los experimentos en donde la dopamina se ha aplicado por microiontoforesis sobre las neuronas estriatales sugieren que el efecto predominante es la depresión de la actividad espontánea, registrada extracelularmente (Dray, 1960). Sin embargo, cuando se estimula la vía nigro-estriatal, el efecto predominante es

excitatorio (Kocsis y cols., 1977; Kocsis y Kitai, 1977). Actualmente existen evidencias de que estas discrepancias podrían deberse a la existencia de dos subclases de receptores dopaminérgicos ( $D_1$  y  $D_2$ ) cuya activación produce efectos opuestos sobre la actividad neuronal y que difieren en su afinidad por la dopamina. Estudios *in vitro* efectuados en rebanadas del neocóstriado de roedores sugieren que la dopamina a bajas concentraciones ( $\approx 1 \mu M$ ) produce excitación en las neuronas GABAérgicas del neocóstriado, posiblemente por estimulación de los receptores  $D_2$ , asociados a la inhibición de la adenilatociclasa (Akaike y cols., 1987). Por otro lado, la dopamina a altas concentraciones ( $\approx 100 \mu M$ ) inhibe la excitabilidad de las mismas neuronas, estimulando los receptores  $D_1$  que activan la producción de ANPC.

Existen evidencias de que muchos efectos conductuales de la dopamina en el neocóstriado se ejercen a través de la activación simultánea de los receptores  $D_1$  y  $D_2$  localizados en las neuronas espinosas medianas de naturaleza GABAérgica y que proyectan sus axones al globo pálido externo y a la sustancia nigra reticulata (Robertson y Robertson, 1986; Rouillard y Bédard, 1986; Starr, 1986). Asimismo, se sabe que las neuronas GABAérgicas de estos dos núcleos envían sus axones a la sustancia nigra compacta, en donde modulan la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas (Grace y Bunney, 1985; Grace y cols., 1980).

### 3) El núcleo pedunculopontino

#### a) Anatomía general

El núcleo pedunculopontino (NPP) se sitúa caudalmente con respecto a la sustancia *nigra*, en el área tegmental mesencefálica (ver la figura 1), a nivel de la decusación del pedúnculo cerebeloso superior (*brachium conjunctivum ascendente*). Utilizando técnicas inmunocitoquímicas, varios investigadores han demostrado en el NPP la presencia de células que contienen acetiltransferasa de colina (Kimura y cols., 1981; Satoh y cols., 1983; Beninato y Spencer, 1987; Tago y cols., 1989). La mayoría de las células colinérgicas en el NPP parecen ser pequeñas y medianas, intercaladas con células más pequeñas y unas pocas grandes, no colinérgicas (Armstrong y cols., 1983; Houser y cols., 1983; Rye y cols., 1984). De acuerdo con la distribución de las neuronas colinérgicas, se ha encontrado que la porción rostral del NPP se localiza dorsolateralmente a la región caudal de la SN (Beninato y Spencer, 1987). En la parte posterior del NPP, a nivel del colículo inferior, las células colinérgicas se agrupan dorsolateralmente al pedúnculo cerebeloso superior, en donde forman la *pars compacta* (Beninato y Spencer, 1987).

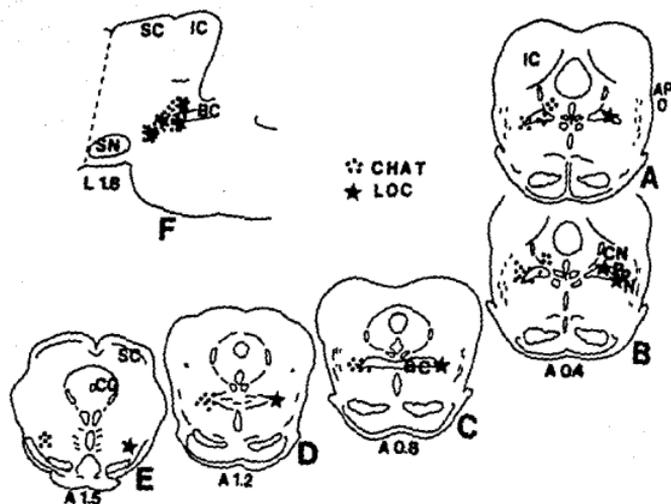


Figura 1

Secciones transversales del mesencéfalo de la rata, mostrando varios planos en el sentido postero-anterior desde A : 0 hasta A : 1.5 (A-E), con referencia a la línea interauricular. En el lado izquierdo de cada sección los puntos representan las localizaciones de células marcadas con acetiltransferasa de colina (CHAT), y las estrellas representan los sitios desde los cuales se induce locomoción (LOC) de acuerdo con los estudios de Skinner y García-Rill (1984). En F se representa un corte sagital del mesencéfalo de la rata (plano estereotáxico L : 1.8) en el cual se muestra la superposición de las células colinérgicas con los sitios que al ser estimulados inducen locomoción. SC = colículo superior; IC = colículo inferior; SN = sustancia nigra; CG = sustancia gris periacueductal; BC = *brachium conjunctivum*; CN = núcleo cuneiforme; PPN = núcleo pedunculopontino. (Figura tomada de García-Rill, 1986).

Un hecho importante que se deriva de estos estudios es que la distribución de las células colinérgicas del NPP se superpone exactamente con la distribución de los sitios que corresponden a la región locomotora mesencefálica (ver la figura 1) que, como se había mencionado, es aquella región desde la cual se puede inducir la locomoción coordinada cuando es estimulada con corriente de baja amplitud, en animales con sección precolicular-postmamilar (García Rill, 1986).

#### **b) Aferentes del núcleo pedunculopontino**

##### **Aferentes de la sustancia *nigra***

Son muchos los trabajos en los cuales, utilizando técnicas de marcaje, se ha demostrado que el NPP recibe proyecciones de la sustancia *nigra reticulata* (Beckstead y Frankfurter, 1982; Gerfen y cols., 1982; Hedreen, 1971; Hopkins y Niessen, 1976) la cual, junto con el núcleo entopeduncular, constituye la principal fuente de salida de los ganglios basales. También han sido realizados estudios electrofisiológicos, en los cuales se ha observado la activación antidrómica de neuronas de la sustancia *nigra*, ante la estimulación eléctrica del NPP (García Rill y cols., 1983). La inervación del NPP por la sustancia *nigra* fué demostrada también por estos investigadores, inyectando marcadores retrógrados en el NPP y localizando posteriormente neuronas marcadas en esta

estructura (García Rill y cols., 1981; García Rill y cols., 1983).

Con base en las evidencias que sugieren que las proyecciones de la sustancia *nigra* al tálamo (Anderson y Yoshida, 1980; Chevalier y Deniau, 1982) y al colículo superior (Anderson y Yoshida, 1980; Kilpatrick y Collinridge, 1982), son GABAérgicas, se ha estudiado la posibilidad de que la inervación del NPP por la SN pudiera ser también de naturaleza GABAérgica. En apoyo a esta idea existen trabajos en los cuales se ha observado que las inyecciones de los antagonistas GABAérgicos, bicuculina y picrotoxina, en el NPP inducen locomoción en gatos con sección precolicular-postmamilar (García Rill y cols., 1985; García Rill y cols., 1983). En cambio se ha encontrado que las inyecciones de GABA y el agonista GABAérgico muscimol, bloquean la locomoción inducida, tanto eléctricamente como por los antagonistas GABAérgicos. La potenciación de la actividad GABAérgica con benzodiazepinas y la falta de efectos de la glicina y su antagonista, estriknina, demuestran que el NPP recibe una entrada GABAérgica y no glicinérgica. Esta entrada inhibitoria podría ser tónicamente activa debido a la alta actividad espontánea observada en las neuronas de la sustancia *nigra* (DeLong y Georgopoulos, 1979; Deniau y cols., 1978).

### Aferentes del núcleo entopeduncular

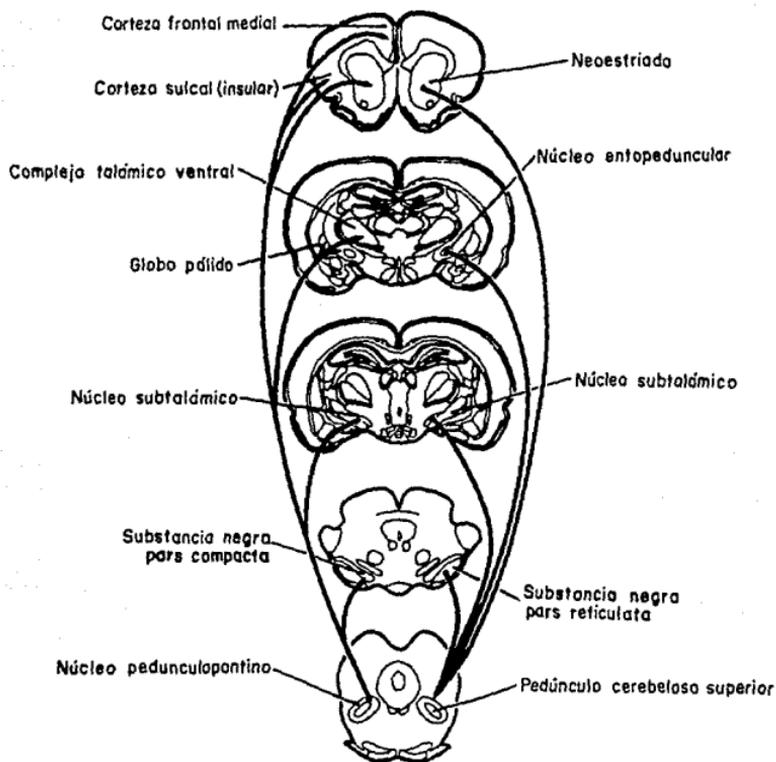
También mediante técnicas de marcaje se ha demostrado que el NPP recibe aferentes del núcleo entopeduncular, equivalente al segmento interno del globo pálido en los primates (Filion y Harnois, 1978; Harnois y Filion, 1980; Jackson y Crossman, 1981; Kim y cols., 1978; Larsen y McBride, 1979). En estudios electrofisiológicos se ha observado que la estimulación eléctrica del núcleo entopeduncular produce potenciales postsinápticos excitatorios e inhibitorios en células del NPP (García Rill y cols., 1981; García Rill y cols., 1983). La entrada del núcleo entopeduncular parece influir principalmente sobre interneuronas y afecta solo a una pequeña proporción de células del NPP que proyectan hacia estructuras inferiores (García Rill y cols., 1981). Se cree que las proyecciones eferentes del núcleo entopeduncular contienen tanto sustancia P como GABA (DiFiglia y cols., 1981; Fonnum y cols., 1978; Hattori y cols., 1973; Jessell y cols., 1978). Por lo tanto, se ha sugerido que los potenciales excitatorios consecutivos a la estimulación del núcleo entopeduncular podrían deberse a una inhibición de la SE (a través de eferentes GABAérgicas a la *pars reticulata*), desinhibiendo así a las neuronas del NPP. Por otro lado, las proyecciones directas del núcleo entopeduncular que utilizan sustancia P, podrían activarlas directamente. Aunque no se ha demostrado hasta ahora

que la sustancia P puede mediar tales efectos, hay observaciones preliminares de que las inyecciones de sustancia P en el NPP inducen locomoción de larga duración (García Rill y Skinner, 1985).

#### Otras vías aferentes

Utilizando técnicas de transporte anterógrado y retrógrado, se ha demostrado también que el NPP recibe aferentes de la corteza cerebral frontal, el neocórtex, el núcleo subtalámico, el globo pálido, y el tálamo ventral (Saper y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983, ver la figura 2). Sin embargo, actualmente no hay información sobre la naturaleza de los neurotransmisores liberados por las proyecciones de la corteza y el núcleo subtalámico al NPP. Los registros intracelulares en el NPP, han revelado que la entrada procedente del globo pálido puede tener componentes tanto excitatorios como inhibitorios.

Por otra parte, se ha propuesto que el núcleo acumbens (Nauta y cols., 1978) y la amígdala (Hopkins y Holstege, 1978; Jackson y Crossman, 1981), también proyectan al NPP, pero esto aún no está bien documentado.



**Figura 2**

Esquema que muestra las conexiones del núcleo pedunculopontino (corte transversal inferior), con los ganglios basales. Las flechas del lado izquierdo de la figura representan las vías eferentes del NPP. Las flechas del lado derecho representan las vías aferentes. (Figura tomada de Saper y Loewy, 1982).

### c) Eferentes del núcleo pedunculopontino

#### Eferentes a la substancia nigra

Los estudios morfológicos han confirmado que el NPP tiene conexiones eferentes con la *pars compacta* de la substancia nigra (Carpenter y cols., 1981; Gerfen y cols., 1982; 1979; Saper y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983; Tokuno y cols., 1988; Gouid y cols., 1989). En este trabajo interesa precisamente la proyección pedunculopontino-nigral, la cual ha sido demostrada no solamente mediante técnicas de marcaje sino también electrofisiológicamente. Por ejemplo, se ha observado que la estimulación eléctrica del NPP provoca respuestas de corta latencia en las neuronas dopaminérgicas de la SNC y se ha sugerido que estas respuestas son el resultado de la activación de una vía monosináptica (Scarnati y cols., 1984). En apoyo a estos resultados se ha demostrado que la estimulación farmacológica del NPP con ácido kaínico, produce un incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la substancia nigra (Clarke y cols., 1987). Por otra parte, se ha reportado que cuando se lesiona electrolíticamente el NPP, se pueden observar axones en degeneración que hacen contactos sinápticos asimétricos con dendritas de neuronas de la SNC, las cuales habían sido marcadas retrogradamente con peroxidasa de

rábano inyectada en el núcleo caudado (Tokuno y cols., 1988). Estos hallazgos son de gran importancia porque sugieren que existe una relación anatómica estrecha entre el NPP y la proyección dopaminérgica nigroestriatal, que podría ayudar a explicar algunos efectos directos e indirectos del NPP sobre las funciones motoras extrapiramidales.

La naturaleza colinérgica de la vía pedunculopontino-nigral, es quizá la más estudiada y mejor documentada en la actualidad. Estudios de inmunohistoquímica han demostrado que entre las neuronas del NPP, existe un prominente grupo de neuronas colinérgicas (Armstrong y cols., 1983; Mesulam y cols., 1983; Satoh y cols., 1983; Tago y cols., 1989).

También se ha demostrado, utilizando anticuerpos monoclonales contra la acetiltransferasa de colina, en combinación con métodos de transporte anterógrado y retrógrado, que el NPP es la mayor fuente de proyecciones colinérgicas a la sustancia *nigra* (Henderson y Greenfield, 1987; Beninato y Spencer, 1987). Estos últimos identificaron además, una vía similar no colinérgica y reportaron que sus hallazgos indican que el NPP podría estar topográficamente organizado con respecto a sus proyecciones eferentes. Según sus resultados, las proyecciones colinérgicas hacia la SN se originan de neuronas localizadas en las porciones predominantemente rostrales del NPP ipsilateral. En este trabajo

no se hace una diferenciación con respecto a la densidad de inervación hacia la SMc y la SMr. Sin embargo, en un estudio más reciente, se demostró la presencia de terminales colinérgicas en la SM, las cuales se originaban de neuronas ubicadas en el complejo colinérgico pontomesencefálico, incluyendo al NPP (Gould y cols., 1989). Estas terminales fueron más abundantes en la *pars compacta* que en la *pars reticulata*. De hecho, los estudios de estos autores sugieren que aproximadamente dos terceras partes de la inervación que proviene del complejo colinérgico pontomesencefálico, termina en la *pars compacta*.

Otras evidencias que apoyan la existencia de la vía colinérgica eferente pedunculopontino-nigral

#### Evidencias Morfológicas.

Además de los estudios de marcaje que demuestran la existencia de una vía colinérgica pedunculopontino-nigral, otros trabajos recientes han demostrado la presencia de aferentes colinérgicas en la SM de la rata. Uno de estos fué el realizado por Beninato y Spencer (1988) quienes, utilizaron anticuerpos monoclonales contra la acetiltransferasa de colina y observaron terminales colinérgicas marcadas en la SM. Estos autores reportaron una mayor cantidad de axones en la *pars compacta*, en comparación con una

distribución relativamente escasa en la *pars reticulata*. Asimismo, observaron numerosas terminaciones abultadas *en passant*, siendo más densas en la mitad de la extensión rostro-caudal de la SHc. En apoyo a estos datos, se han localizado terminales colinérgicas haciendo contactos sinápticos asimétricos con dendritas morfológicamente similares a las de las neuronas dopaminérgicas de la SHc (Martínez-Murillo y cols. 1989).

#### Evidencias bioquímicas.

Se sabe que en la sustancia *nigra* existen niveles detectables de acetilcolina (Jacobowitz y Goldberg, 1977), así como de acetiltransferasa de colina, la enzima responsable de su síntesis (Niccullon y Dusticier, 1980). La actividad de esta enzima en humanos es cuatro veces más alta en la *pars compacta* que en la *pars reticulata* (Lloyd y cols., 1975), mientras que en la rata se ha observado que esta relación es de tres a uno (Kobayashi y cols., 1975). En concordancia con esto, se ha demostrado también la presencia de un sistema de captación de [<sup>3</sup>H]-colina (colina tritlada) dependiente de sodio en rebanadas de sustancia *nigra* de rata, así como un proceso de liberación de [<sup>3</sup>H]-acetilcolina que requiere la presencia de calcio en el medio extracelular (Massey y James, 1978).

Por otra parte, Llinás y Greenfield (1987), utilizando una reacción quimio-luminiscente, examinaron la liberación de acetilcolinesterasas en rebanadas de la SH de cobayo. Con esta técnica demostraron directamente que la acetilcolinesterasa es liberada de manera espontánea de los somas y las dendritas de las neuronas dopaminérgicas nigrales. La liberación dendrítica de acetilcolinesterasa en la SH también ocurre en la rata (Weston y Greenfield, 1986) y algunos autores han aportado evidencias de que la enzima podría tener una función independiente de su acción catalítica (Greenfield, y cols., 1981, 1986). Aunque ciertamente, la sola presencia de colinesterasas en la SHc no demuestra la existencia de un sistema colinérgico activo, si sugiere, en conjunto con las demás evidencias, que las neuronas dopaminérgicas son colinoceptivas.

#### **Evidencias farmacológicas y electrofisiológicas.**

Se ha reportado que las neuronas dopaminérgicas de la SHc tienen una alta densidad de receptores nicotínicos (Clarke y Pert, 1985; Clarke y cols., 1985). Aparentemente la mayor parte de estos receptores se localiza en los somas de las neuronas dopaminérgicas, puesto que se ha demostrado que la lesión unilateral de la SH con 6-HODA, reduce de manera importante los sitios de unión para la [ $^3$ H] nicotina en la *pars compacta* (Clarke

y Pert, 1985). Estos resultados son compatibles con el hecho de que la administración de nicotina por vía subcutánea o iontoforética, incrementa la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas (Lichtensteiger y cols., 1982; Clarke y cols., 1985; Grenhoff y cols., 1986). Se ha reportado también, que la administración iontoforética de acetilcolina en la *pars compacta* de la sustancia *nigra*, aumenta la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas y que este efecto es bloqueado por el antagonista nicotínico dihidro- $\beta$ -eritroidina (Lichtensteiger y cols., 1982). Sin embargo, otros investigadores han observado que la acetilcolina no ejerce un efecto excitatorio sobre las neuronas dopaminérgicas (Collingridge y Davies 1981). Es posible que el efecto inconsistente de la acetilcolina se deba a la gran cantidad de colinesterasas que son liberadas de las neuronas dopaminérgicas (Lehmann y Fibiger, 1978; Llinás y Greenfield, 1987) y que podrían limitar su acción. La idea de que existen receptores nicotínicos en las neuronas dopaminérgicas de la SH, también se ve apoyada por un estudio en el cual se inyectó ácido kainico en el NPP observándose un incremento en la tasa de disparo de estas neuronas. El efecto inducido por el kainato fué bloqueado mediante la administración intravenosa de mecamilamina, un antagonista colinérgico nicotínico que actúa centralmente (Clarke y cols. 1987).

Por otra parte, también se han encontrado receptores

colinérgicos muscarínicos en la SN, mediante la estimación de los sitios de unión al [<sup>3</sup>H]-benzilato de quinuclidinilo. Estos receptores parecen estar localizados en las dendritas o los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas nigrales pues se reducen en forma significativa al aplicar 6-HODA en la SN (Cross y Waddington, 1980). Se ha propuesto que la estimulación de los receptores colinérgicos muscarínicos en la SN podría modular la actividad de las neuronas dopaminérgicas (James y Massey, 1976).

#### Evidencias Conductuales

Entre las evidencias de tipo conductual están los estudios que sugieren que la conducta de alimentación puede ser inducida por sustancias colinérgicas administradas en la SN (Winn y cols., 1963; Winn y Redgrave 1981). Estos investigadores lograron inducir la conducta de alimentación en ratas saciadas, aplicando mezclas de ACh y eserina, y observaron que la conducta se hacía más débil a medida que se incrementaba la distancia del sitio de inyección de la *pars compacta*. Complementariamente, Taha y Redgrave (1980) demostraron que el haloperidol (un antagonista de los receptores dopaminérgicos), administrado en bajas dosis, bloquea la conducta de alimentación inducida por la aplicación de carbacol en la SN, lo cual sugiere que el sistema dopaminérgico nigroestriatal está involucrado en la producción de esta conducta.

## **Eferentes a la formación reticular**

Existen estudios en los cuales, mediante la inyección de aminoácidos tritiados en el NPP, se ha demostrado la existencia de una proyección hacia la zona de transición entre las áreas gigantocelular y magnocelular en la formación reticular medular (García Rill y cols., 1983). Esta estructura parece ser el mejor candidato para mediar la actividad de locomoción durante la estimulación del NPP, ya que de esta zona se originan las proyecciones reticulospinales (Brodal, 1981). De hecho, las inyecciones de marcadores retrógrados en las regiones gigante y magnocelular de la formación reticular, producen marcaje de un gran número de células del NPP (García Rill y cols., 1985; Skinner y cols., 1985). Estas proyecciones descendentes del NPP hacia la formación reticular, parecen ser colinérgicas en parte (Rye y cols., 1984). Además, un hecho importante es que las proyecciones colinérgicas a la formación reticular medular, están involucradas en la locomoción (García Rill y cols., 1985). Estos investigadores observaron que las inyecciones de anticolinesterasas, como la fisostigmina, en la zona de transición gigante-magnocelular, inducen locomoción en gatos con sección precolicular-postmamilar. En este estudio se demostró que los agonistas colinérgicos, carbacol y metacolina son también

efectivos, y que las inyecciones de atropina en la formación reticular medular, bloquea la locomoción inducida por los agonistas colinérgicos. Estos mismos experimentos han revelado además que las inyecciones de sustancia P en la formación reticular medular, inducen locomoción, lo cual es apoyado por evidencias que demuestran la presencia de neuronas, tanto colinérgicas como peptidérgicas, en el HPP (Vicent y cols., 1983). Sin embargo, solo una pequeña proporción de las proyecciones descendentes del HPP a la formación reticular medular parece ser colinérgica (Rye y cols., 1984), y queda por determinar qué otros neurotransmisores se expresan activamente en esta vía.

Puede decirse entonces, que el HPP asume una importante posición, ya que podría estar mediando una relación funcional entre los ganglios basales y el sistema motor inferior. Por lo tanto, es posible que sea el núcleo de relevo a través del cual los ganglios basales influyan sobre la actividad motora, independientemente o en paralelo con los circuitos tálamo-espinal y cortico-espinal.

#### **Otras vías eferentes**

Como ya se ha mencionado, el HPP tiene conexiones eferentes con la mayoría de los ganglios basales, además de la SNC,

incluyendo el núcleo subtalámico (Carpenter y cols., 1981; Saper y Loewy, 1982; Moon y Graybiel, 1980; Nomura y cols., 1980; Jackson y Crossman, 1983), el segmento interno del globo pálido o núcleo entopeduncular (Carpenter y cols., 1981; Graybiel, 1977; Saper y Loewy, 1982), el globo pálido (DeVito y cols., 1980; Saper y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983) y el neocórtex (Saper y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983), así como la corteza frontal (Saper y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983) y el tálamo (Saper y Loewy, 1982; Moon y Graybiel, 1980; Nomura y cols., 1980; Jackson y Crossman, 1983), ver la figura 2. La mayor parte de las proyecciones del NPP a estas estructuras cursan ipsilateralmente aunque se ha observado que un componente menor se proyecta contralateralmente dando un marcaje similar pero menos denso que en el lado ipsilateral (Saper y Loewy, 1982).

La naturaleza de estas vías eferentes no ha sido suficientemente estudiada en la actualidad, sin embargo, recientes estudios sobre las vías ascendentes del NPP han sugerido la presencia de proyecciones colinérgicas parciales hacia los núcleos centromediano y subtalámico (Sugimoto y Hattori, 1984).

**d) Relación funcional del núcleo pedunculopontino con la corteza y los ganglios basales.**

Desde hace tiempo se sabe que la corteza motora no solamente

recibe una entrada somatosensorial, sino también aferencias visuales y vestibulares (Brooks y cols., 1961; Buser y cols., 1964). Aun más, se sabe que la entrada visual a la corteza motora en el gato llega principalmente a las áreas que representan las partes proximales de las extremidades y el eje corporal (García Rill y Dubrovsky, 1973), ocurriendo algo similar con la entrada vestibular (Boisacqs-Shepens y Hanus, 1972). Se ha sugerido que la convergencia de estas entradas al área motora representativa del eje corporal (corteza motora axial), podría ayudar a constituir un eje de referencia cuya orientación está dada por la dirección de la fuerza de gravedad. Este eje sería el sistema de coordenadas contra el cual se evaluaría el medio circundante y se ejecutarían los movimientos extrapersonalmente dirigidos (Bernstein, 1972; citado por García-Rill, 1986).

Ahora bien, se ha encontrado que la corteza motora axial proyecta principalmente al neocórtex mientras que la corteza motora que inerva la parte distal de las extremidades proyecta a otras estructuras subcorticales (García-Rill y cols., 1979). En el mono, esta información que se proyecta al neocórtex es enviada también directamente al núcleo pedunculopontino (Kuyppers y cols., 1967), y existe un estudio en el cual se ha demostrado que las inyecciones de aminoácidos tritiados en la corteza motora axial del gato, produce marcaje de una vía que se proyecta al núcleo pedunculopontino (García-Rill y cols., 1981).

Con base en lo anterior, García-Rill (1986) ha especulado que las estructuras antes mencionadas pueden estar involucradas en una serie de funciones que son necesarias para el desempeño de secuencias de movimientos voluntarios, tales como la locomoción, la cual requiere de un eje de referencia y un ajuste postural que es verificado constantemente durante el desplazamiento.

#### e) Relación con la fisiopatología extrapiramidal.

La enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer son dos patologías que cursan con trastornos motores y en las cuales se ha visto involucrado el NPP.

Los síntomas que se presentan en la enfermedad de Parkinson son, principalmente, acinesia, rigidez, temblor en reposo, marcha apresurada y pérdida de los reflejos posturales (Bartholini, 1980). La causa primaria de estas alteraciones es la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la *substantia nigra* (Hornykiewicz, 1972). La falta de inervación dopaminérgica del neocórtico, aparentemente altera el funcionamiento de los ganglios basales y consecuentemente sus salidas. Por ejemplo, los desórdenes en la locomoción observados en la enfermedad de Parkinson no parecen deberse a una alteración

de los mecanismos de marcha como tales, sino a una deficiencia en el control del desplazamiento del centro de gravedad corporal y a una falla en los mecanismos de ajuste postural, lo cual aparentemente involucra la salida de los ganglios basales al NPP (Martin, 1967; citado por Garcia-Rill, 1986). Es importante señalar que en la enfermedad de Parkinson se ha observado la pérdida de neuronas en la región del NPP (Papez, 1942; citado por Beninato y Spencer, 1987), lo cual probablemente explique la reducción de los niveles de acetiltransferasa de colina en la SN de los pacientes parkinsonianos (Lloyd y cols., 1975; Javoy-Agid y cols., 1981). Además, el NPP ha sido señalado como una fuente del temblor en reposo característico de esta enfermedad (Aronson y cols., 1982; citado por Beninato y Spencer, 1987). Aunque escasos, estos últimos datos sugieren que la proyección colinérgica pedunculopontino-nigral podría tener un papel significativo en el funcionamiento de los ganglios basales y estar involucrada en algunas alteraciones observadas en la enfermedad de Parkinson.

En la enfermedad de Alzheimer, el síntoma clínico predominante es la demencia, incluyendo deficiencias en la concentración, en la memoria reciente y pasada, así como cambios en el comportamiento (Semple y cols., 1982). Generalmente se ha hecho énfasis en las alteraciones cognoscitivas y en los disturbios psicológicos de esta enfermedad; sin embargo, aún en etapas tempranas existen

claros signos de rigidez y dificultades en el inicio y mantenimiento del ritmo en la locomoción (Sjögren y cols., 1966). La rigidez observada en estos pacientes es diferente a la que se presenta en la enfermedad de Parkinson, pero también va acompañada de anomalías posturales.

El elemento patológico básico en la enfermedad de Alzheimer es la pérdida de neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert (Whitehouse y cols., 1981; Nagai y cols., 1985). La consiguiente reducción de la inervación colinérgica del hipocampo y la corteza frontal podría explicar las deficiencias cognitivas observadas en estos pacientes (Semple y cols., 1982). En cambio, los desórdenes motores y posturales podrían explicarse por la pérdida de neuronas colinérgicas del NPP y quizá del neocórtex y la corteza motora. De hecho, se ha sugerido que las neuronas del NPP podrían estar degeneradas en la enfermedad de Alzheimer (Vincent y cols., 1983). Básicamente, estas dos enfermedades pueden influir la orientación espacial, el control del centro de gravedad corporal y el inicio y término de los eventos motores, afectando la vía corteza-ganglios basales-NPP, a diferentes niveles.

## II. OBJETIVOS E HIPOTESIS

En conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que en la SH existe un sistema colinérgico activo, que podría modular la actividad del sistema dopaminérgico nigroestriatal. Por lo tanto, el primer objetivo que se planteó para el desarrollo de este trabajo fué investigar si la acetilcolina endógena liberada por las terminales colinérgicas en la sustancia *nigra* puede modular el recambio de dopamina en el neocestriado, estimado a través de la producción de su metabolito más inmediato, el ácido dihidroxifenilacético (DOPAC). Así, nuestra primera hipótesis fué la siguiente:

Hipótesis 1) Si las terminales colinérgicas en la sustancia *nigra* están acopladas funcionalmente a las neuronas dopaminérgicas, la aplicación local de fisostigmina modificará la concentración de DOPAC en el neocestriado.

Como segundo objetivo nos propusimos confirmar si las terminales colinérgicas que regulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas tienen su origen en el núcleo pedunculopontino, y para ello planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis 2) Si las terminales colinérgicas que regulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas tienen su origen en el núcleo pedunculopontino, la estimulación de este núcleo mediante la administración local de ácido kaínico, deberá modificar la concentración de DOPAC en el neocórtex. Este efecto deberá bloquearse con antagonistas colinérgicos muscarínicos y/o nicotínicos.

### III. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para comprobar las hipótesis anteriores las series experimentales realizadas fueron las siguientes:

1) Un grupo al cual se administró fisostigmina por vía sistémica. La señal de DOPAC se registró voltaméricamente en el neocstriado (n = 5).

2) Un grupo al cual se administró escopolamina (i.p.) y cuarenta minutos después, fisostigmina (s.c.). La señal de DOPAC se registró voltaméricamente en el neocstriado (n = 4).

3) Un grupo al cual se administró escopolamina (i.p.) y cuarenta minutos después, un volumen equivalente de solución salina (i.p.). La señal de DOPAC se registró voltaméricamente en el neocstriado (n = 5).

4) Un grupo al cual se administró pargilina (i.p.) y cien minutos después, fisostigmina (s.c.). La señal de dopamina se registró por voltametría de pulso normal diferencial (n = 4).

5) Un grupo al cual se administró fisostigmina en la sustancia *nigra*. La señal de DOPAC se registró voltaméricamente en el neocstriado ipsilateral (n = 5).

6) Un grupo al cual se administró fisostigmina, aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  por arriba de la sustancia *nigra*. La

señal de DOPAC se registró voltamétricamente en el neocestriado ipsilateral (n = 5).

7) Un grupo al cual se administró fisostigmina, aproximadamente 1 mm por arriba de la substancia *nigra*. La señal de DOPAC se registró voltamétricamente en el neocestriado ipsilateral (n = 3).

8) Un grupo al cual se administró solución salina en la substancia *nigra* y cuarenta minutos después, di-muscarina también en la substancia *nigra*. La señal de DOPAC se registró voltamétricamente en el neocestriado ipsilateral (n = 5).

9) Un grupo al cual se administró pirenzepina en la substancia *nigra* y cuarenta minutos después, pirenzepina + di-muscarina también en la substancia *nigra*. La señal de DOPAC se registró voltamétricamente en el neocestriado ipsilateral (n = 4).

10) Un grupo al cual se administró AF DX-116 en la substancia *nigra* y cuarenta minutos después, AF DX-116 + di-muscarina también en la substancia *nigra*. La señal de DOPAC se registró voltamétricamente en el neocestriado ipsilateral (n = 4).

11) Un grupo al cual se administró solución salina en el núcleo pedunculopontino y cuarenta minutos después, ácido Kainico también en el núcleo pedunculopontino. La señal de DOPAC se registró voltamétricamente en el neocestriado ipsilateral (n = 5).

12) Un grupo al cual se administró escopolamina (i.p.) y cuarenta minutos después, ácido Kainico en el núcleo pedunculopontino. La señal de DOPAC se registró voltamétricamente

en el neocstriado ipsilateral (n = 4).

13) Un grupo al cual se administró mecamilamina (i.p.) y cuarenta minutos después, ácido Kainico en el núcleo pedunculopontino. La señal de DOPAC se registró voltaméricamente en el neocstriado ipsilateral (n = 3).

En todos los casos en que se administró solución salina, ésta fue isotónica, con amortiguador de fosfatos (pH = 7.4) y el volumen administrado en cada caso fue el mismo en que se aplicaron los fármacos (0.5 µl). Los registros voltaméricos se prolongaron 180 minutos después de la administración de los fármacos. El efecto de las manipulaciones farmacológicas sobre la concentración de DOPAC se comparó, entre los grupos experimentales, utilizando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

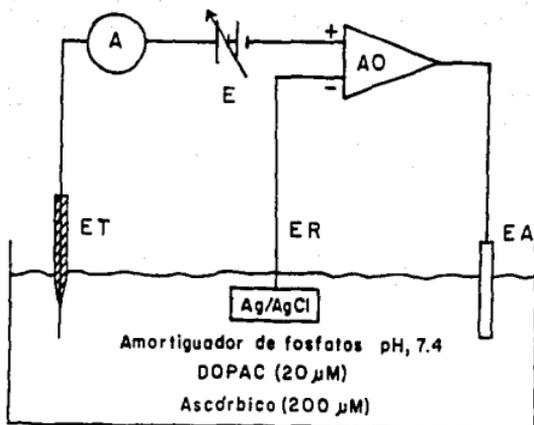
#### IV. MATERIAL Y METODOS

##### A) El método de voltametría.

La voltametría se desarrolló a partir de la polarografía descubierta por Heyrovsky en 1924, quien observó que mediante la aplicación de un voltaje a una solución química, se generaba una corriente como consecuencia de la oxidación de los compuestos disueltos, la cual podía usarse para medir la concentración de dichas sustancias (Stamford, 1985, 1986).

Actualmente, el procedimiento consiste en aplicar un potencial conocido a un electrodo hecho de carbono (electrodo de trabajo). Este potencial se aplica en relación al voltaje estable proporcionado por un electrodo de referencia (usualmente plata-cloruro de plata; ver la figura 3). Cuando el potencial aplicado al electrodo de trabajo alcanza el potencial de oxidación de las sustancias presentes en el medio, se produce una corriente de electrones hacia la superficie activa del electrodo de trabajo y la magnitud de esta corriente es proporcional a la concentración de las especies oxidables (Adams y Marsden, 1982; Stamford, 1985, 1986). Además, se añade al circuito un electrodo auxiliar para eliminar corrientes contaminantes.

La corriente que fluye al electrodo de trabajo tiene dos



**FIGURA 3**

**Circuito de voltametría con tres electrodos**

A un electrodo de trabajo (ET) se le aplica un potencial conocido (E) con respecto a un electrodo de referencia (ER). Cuando este potencial alcanza el potencial de oxidación de los compuestos en solución, se genera una corriente proporcional a su concentración, la cual se mide con un amperímetro (A). Para evitar que esta corriente atraviese el electrodo de referencia y modifique su potencial, se añade al circuito un amplificador operacional (AO) que la antagoniza mediante la inyección de una corriente opuesta a través de un electrodo auxiliar (EA).  
 DOPAC = ácido dihidroxifenilacético.

componentes: la corriente de carga y la corriente de Faraday. La corriente de carga no está relacionada con el proceso de oxidación y reducción y se debe a la doble capa eléctrica de la superficie del electrodo (Adams y Marsden, 1982). En cambio, la corriente de Faraday se debe al proceso de oxidación y reducción. La mayoría de las técnicas voltamétricas están dirigidas a incrementar la corriente de Faraday y reducir la corriente de carga (Stamford, 1985). Una forma de lograr esto consiste en aplicar incrementos lentos de voltaje, ya que estos aumentan el cociente entre la corriente de Faraday y la corriente de carga (la corriente de Faraday es directamente proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de incremento de voltaje, mientras que la corriente de carga es directamente proporcional a esta última).

#### 1) Cronoamperometría.

La forma de onda del potencial aplicado también determina la razón de la corriente de Faraday a la de carga. La forma de onda más simple es un pulso rectangular de voltaje. El voltaje es incrementado instantáneamente hasta un potencial suficiente para oxidar el componente bajo investigación y se mantiene durante un segundo aproximadamente (Adams y Marsden, 1982; Marsden y cols., 1986). La corriente muestra entonces una meseta transitoria seguida de una caída a un nivel fijo y se mide antes y al final

del pulso de voltaje. Este procedimiento conocido como cronoamperometría tiene la ventaja de que en la siguiente aplicación de un pulso de voltaje, la corriente de carga declina más rápidamente que la corriente de Faraday. Con este método pueden obtenerse medidas adecuadas de la concentración de las sustancias oxidables pero no permite discriminarlas entre sí, es decir tiene poca resolución.

## 2) Voltametría de pulso diferencial.

La voltametría de pulso diferencial (VPD) es una combinación de la cronoamperometría y de la voltametría de barrido lineal. Consiste en aplicar pequeños pulsos rectangulares de voltaje sobre una rampa de voltaje lineal (ver la figura 4). Los pulsos rectangulares son aplicados tres veces por segundo y la corriente generada al final del pulso se resta de la corriente medida inmediatamente antes de aplicarlo. La VPD obtiene su nombre del hecho de que la corriente de salida es virtualmente una derivada de la corriente de barrido lineal (Stamford, 1985). Esta técnica combina la principal ventaja de la cronoamperometría (supresión de la corriente de carga) con la resolución de la voltametría de barrido lineal (Adams y Marsden, 1982). Dado que genera picos, en vez de mesetas, su resolución es muy alta.

## VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

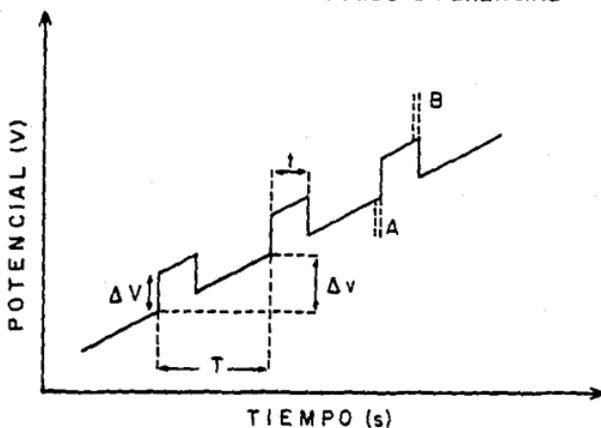


FIGURA 4

### Principio general de la voltametría de pulso diferencial

A una rampa lineal de potencial ( $\Delta v$ ) se le superponen pulsos rectangulares de amplitud ( $\Delta V$ ) y duración ( $t$ ) constantes, con un período ( $T$ ). La diferencia de corriente generada entre A y B por la oxidación de los compuestos, es una medida de su concentración en la solución.

### 3) Aplicaciones de la voltametría de pulso diferencial.

Las técnicas electroquímicas para la medición *in vivo* de neurotransmisores en el tejido cerebral han sido aplicadas especialmente a las catecolaminas y a los 5-hidroxiindoles, los cuales son fácilmente oxidables (Gonon y cols., 1980; Gonon, 1984; Adams y Marsden, 1982; Marsden y cols., 1988). Sin embargo, las mediciones se complican por la presencia de otros compuestos oxidables en el tejido cerebral, tales como el ácido ascórbico (AA), cuya oxidación puede enmascarar las señales de oxidación de las catecolaminas (Gonon y cols., 1980), y el ácido úrico que interfiere con la medición de los 5-hidroxiindoles (Marsden y cols., 1988). Afortunadamente, en la actualidad ya se han diseñado técnicas que permiten separar las señales de oxidación de los catecoles de las del AA (Gonon y cols., 1980, 1981b).

En el presente trabajo se utilizó la técnica de voltametría de pulso diferencial descrita por Gonon y cols. (1980, 1981b). Estos autores reportaron que el método de VPD en combinación con electrodos de fibra de carbono (ver la figura 5) tratados electroquímicamente (Gonon y cols., 1981), permite obtener señales estables y reproducibles en las cuales los potenciales de oxidación del AA y los catecoles son separados perfectamente (ver la figura 6). Con este método se ha reportado que el AA se oxida

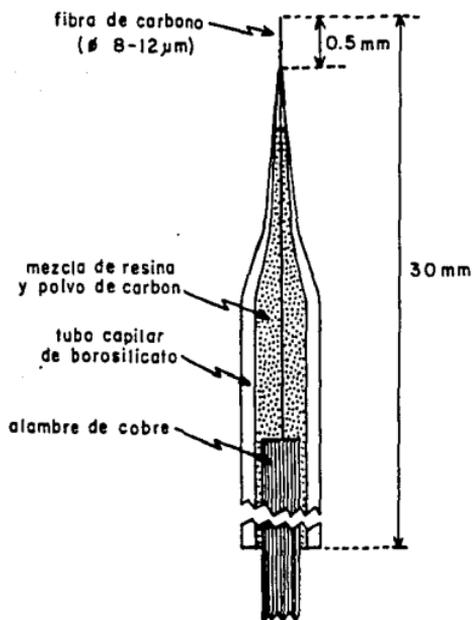


FIGURA 5

Esquema de un electrodo de fibra de carbono

a -50 mV y los catecoles a +100 mV (Gonon y cols., 1980, 1981b). La señal de oxidación del ácido úrico no interfiere con la de los catecoles, ya que su potencial de oxidación es cercano a +300 mV (Marsden y cols., 1988). Sin embargo, no es posible discriminar las señales de oxidación de la dopamina y su principal metabolito, el ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), porque ambos compuestos se oxidan a un mismo potencial (Gonon y cols., 1980). Puesto que en el neocstriado la concentración de DOPAC es aproximadamente mil veces mayor que la concentración de dopamina (Gonon y Buda, 1985), esta técnica tiene el inconveniente de que el electrodo de fibra de carbono detecta principalmente el DOPAC. Esto se ha demostrado experimentalmente bloqueando la formación de DOPAC mediante la administración de inhibidores de la monoaminooxidasa (Gonon y cols., 1980). Así, después de administrar pargilina (75 mg/Kg, i.p.) la señal de oxidación de las catecolaminas normalmente desaparece en una hora (Gonon y cols., 1981b). Utilizando esta maniobra farmacológica, en combinación con una variante de la VPD conocida como voltametría de pulso normal diferencial, Gonon y Buda (1985) han logrado registrar la señal de oxidación de la dopamina en el neocstriado de la rata. En el presente trabajo hemos utilizado este último método para medir los cambios en la concentración de dopamina producidos por la administración subcutánea de fisostigmina. Sin embargo, no lo hemos empleado sistemáticamente por las dificultades técnicas que implica, especialmente el bajo porcentaje de ocasiones (< 20 %) en las

cuales es posible detectar la señal de oxidación de la dopamina. En su lugar, hemos registrado los cambios en la concentración extracelular de DOPAC en el neocórtico de ratas anestesiadas, para investigar si las terminales colinérgicas que llegan a la sustancia *nigra* ejercen alguna influencia sobre la actividad de la vía dopaminérgica nigroestriatal. Aquí cabe mencionar que, aunque se ha sugerido que el DOPAC no es un buen índice de la neurotransmisión dopaminérgica (Comissiong, 1985; Westerink, 1985), si es un buen indicador del recambio de la dopamina (Westerink, 1985).

#### B) Fabricación de los electrodos

Los electrodos para VPD se fabrican introduciendo una fibra de carbón puro (diámetro de 8 a 12  $\mu\text{m}$ ; Le carbone Lorraine, Ref. Agt. 10 000) en un tubo capilar de borosilicato (Kimble, U.S.A. Ref. 46 485) que ha sido adelgazado en un extremo, del cual debe sobresalir la fibra de carbón aproximadamente entre 500 y 750  $\mu\text{m}$  (Fonchon y cols, 1979). Posteriormente el tubo capilar se llena con una pasta hecha de una mezcla de polvo de carbón (partículas de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro; Ultra Carbón Corp. MI, U.S.A., Ref. UCP 1 M) y resina poliéster (Escil, Sody 33), la cual es empacada a presión con la ayuda de un alambre de cobre (ver la figura 5). Finalmente, los electrodos se dejan reposar 12 horas a temperatura

ambiente y posteriormente 12 horas a 60 °C para favorecer la polimerización de la resina (Gonon y cols., 1981b).

Estos electrodos tienen la siguientes ventajas: producen un daño tisular mínimo porque su diámetro es muy pequeño y sin embargo, la superficie electroactiva proporcionada por la punta que sobresale del capilar de vidrio, es lo suficientemente grande como para registrar corrientes de oxidación de pequeñas concentraciones de sustancias.

Se ha reportado que una vez implantados en el tejido cerebral, los electrodos de fibra de carbono, en combinación con la VPD, retienen su sensibilidad al DOPAC por un tiempo máximo de 8 horas (Marsden y cols., 1986). Por lo tanto, su principal desventaja es que no pueden utilizarse para efectuar registros por periodos prolongados.

### C) Tratamiento electroquímico de los electrodos

Los electrodos de fibra de carbono requieren de un tratamiento electroquímico (Gonon y cols., 1981, 1984) para poder discriminar la corriente de oxidación de los catecoles de la del ácido ascórbico, el cual es muy abundante en el neocstriado. Para tal efecto, la punta de carbono del electrodo de trabajo es sumergida en un amortiguador de fosfatos (pH = 7.4) junto con los electrodos de referencia y auxiliar (ver la figura 3), y a través de esta

solución se aplican los siguientes pulsos de corriente generados con un voltámetro (Tacussel, Mod. PRG 5; Lyon, Francia):

1. Pulsos triangulares de 70 Hz de 0.06 a 2.6 V; con una intensidad de corriente de 250  $\mu$ A, durante 20 s.

2. Un pulso de corriente directa de -0.74 V; con una intensidad de corriente de 5  $\mu$ A, durante 5 s.

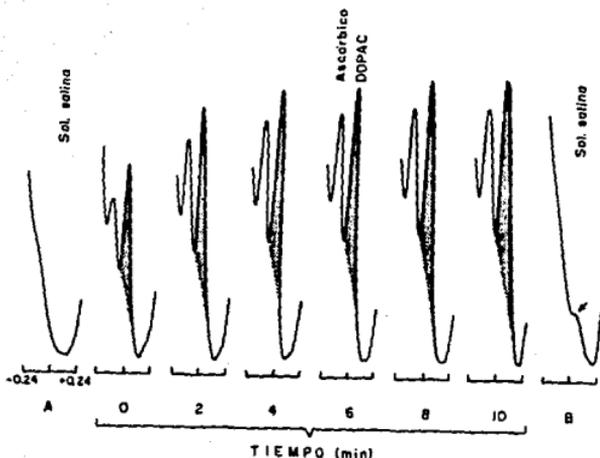
3. Un pulso de corriente directa de 1.55 V; con una intensidad de corriente de 5  $\mu$ A, durante 5 s.

#### D) Calibración de los electrodos

Los electrodos así tratados son calibrados *in vitro* (ver la figura 3), sumergiendo la punta de carbono en el amortiguador de fosfatos al cual se le han añadido DOPAC (20  $\mu$ M) y ácido ascórbico (200  $\mu$ M). Los electrodos de referencia y auxiliar se sumergen en la misma solución y se aplica una rampa de potencial de -240 a +180 mV (velocidad de incremento: 10 mV/s), a la cual se le superponen pulsos rectangulares de 50 mV de amplitud y 40 ms de duración, con un periodo de 200 ms (Gonon y cols., 1981b). Con estos parámetros se ha observado que el potencial de oxidación del AA es de aproximadamente -50 mV y el del DOPAC de +100 mV (Gonon y

cols., 1980, 1981b). Durante la calibración *in vitro* las rampas de potencial se aplican cada dos minutos hasta que la señal de oxidación del DOPAC permanece estable (Gonon y cols., 1981b). Como puede observarse en la figura 6, se requiere de la aplicación de varias rampas de potencial antes de que se estabilice la señal. Por lo tanto, estos electrodos no miden instantáneamente la concentración de catecolaminas en el medio, pues su constante de tiempo es de varios minutos (ver la figura 7). Una vez estabilizada la señal de oxidación, esta es directamente proporcional a la concentración de DOPAC en la solución, en el rango de 1 a 50  $\mu\text{M}$  (Gonon y cols., 1981b).

En el caso de la dopamina, los electrodos se sumergieron en una solución con dopamina (20-100 nM) y ácido ascórbico (200  $\mu\text{M}$ ). En estas condiciones, se aplicaron rampas de potencial de -240 a +240 mV, en el modo de voltametría de pulso normal diferencial, el cual incrementa la sensibilidad para las catecolaminas (Gonon y cols., 1984). Los parámetros fueron los siguientes: velocidad de incremento de voltaje, 4 mV/s; duración del prepulso, 70 ms; pulsos de medición de 30 mV de amplitud y 40 ms de duración, con un período de 400 ms (Gonon y Buda, 1985).



**FIGURA 6**

**Calibración in vitro de los electrodos de fibra de carbono**

Inicialmente, los tres electrodos se sumergen en una solución salina amortiguada (figura 3) y se aplica una rampa de potencial (figura 4), obteniéndose el registro voltamétrico basal (A). Posteriormente se añaden el ácido dihidroxifenilacético (DOPAC, 20  $\mu$ M) y el ácido ascórbico (200  $\mu$ M) y se aplican las rampas de potencial cada dos minutos, hasta que la altura de los picos permanece constante. Obsérvese que es necesario aplicar varias rampas de potencial antes de que las señales permanezcan estables. En este caso, el potencial de oxidación del ácido ascórbico fué de -100 mV y el del DOPAC de +30 mV (área sombreada). Por último (B), los electrodos se sumergen de nuevo en la solución salina sin los compuestos oxidables y se aplican varias rampas de potencial para eliminar las señales residuales debidas a la adsorción de los compuestos a la superficie de la fibra de carbono (flecha).

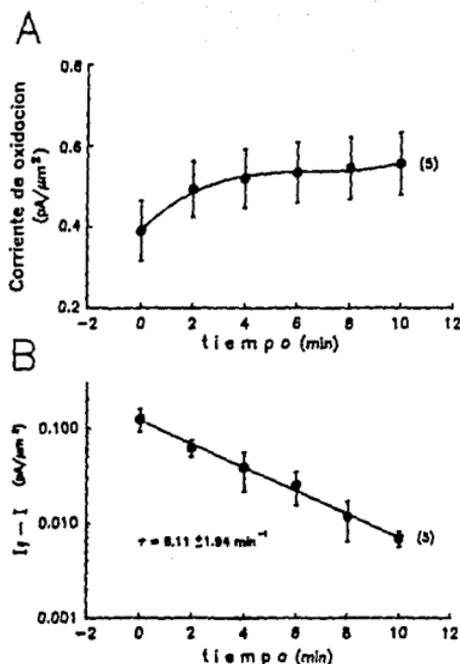


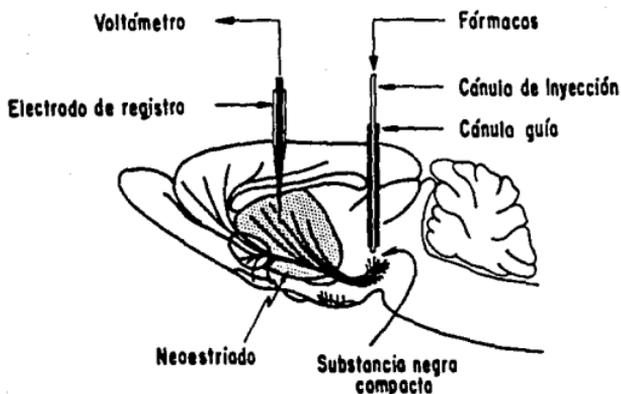
FIGURA 7

**Velocidad de respuesta de los electrodos de fibra de carbono utilizados en la voltametría de pulso diferencial**

Los electrodos fueron calibrados tal como se describe en la figura 6. En la gráfica A, la corriente de oxidación del DOPAC se presenta como función de las rampas de potencial aplicadas a intervalos de dos minutos. La corriente fué normalizada expresándola en  $iA$  por  $\mu m^2$  de superficie de la fibra de carbono que sobresalía del tubo capilar. Para calcular la superficie se supuso que las fibras tienen un diámetro promedio de  $10 \mu m$ . En la gráfica B, la corriente de oxidación se expresa como el logaritmo de la diferencia entre la corriente medida cuando la señal ya se ha estabilizado ( $I_2$ ) y la corriente registrada en los pulsos precedentes ( $I_1$ ). Las medias se dispusieron en una línea recta con un solo componente. La constante de tiempo ( $\tau$ ) se calculó a partir de la pendiente. En ambas gráficas, cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de mediciones efectuadas en cinco electrodos.

### E) Mediciones de DOPAC en el neoestriado

Las mediciones de DOPAC reportadas en este trabajo fueron efectuadas en el neoestriado derecho de ratas machos de la cepa Wistar (290-320 g), anestesiadas con hidrato de cloral (300 mg/Kg i.p.) y mantenidas bajo anestesia con inyecciones adicionales (aproximadamente 1/4 de la dosis inicial cada 40-50 minutos). Los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico con la barra de los incisivos situada a 3.3 mm por debajo del nivel de las barras auriculares. Como punto de referencia para implantar los electrodos y las cánulas se utilizó bregma, ya que se ha reportado que en ratas con diferente peso existe menos variación en la posición de los núcleos cerebrales con respecto a este punto que con referencia a la línea interauricular (Whishaw y cols., 1977). Después de efectuar una trepanación y de romper cuidadosamente la duramadre, los electrodos de fibra de carbono fueron implantados en las siguientes coordenadas: con referencia a bregma, AP = +1.5 mm ML = -2.6 mm, y con referencia a la superficie de la corteza cerebral, los electrodos se hicieron descender hasta que se obtuvo la máxima señal de DOPAC, normalmente a -4 ó -4.5 mm (ver la figura 8). Los electrodos de referencia y auxiliar se colocaron subcutáneamente, en una incisión practicada en la piel del cuello.



**FIGURA 8**

**Esquema de la preparación para la medición del DOPAC en el neostriado de la ratas anestesiada**

Representación esquemática de un corte sagital del cerebro de la ratas, en el que se ilustra la vía dopaminérgica nigro-estriatal. La punta de fibra de carbono del electrodo de trabajo se implanta en el neostriado (area sombreada). Los fármacos se administran directamente en la sustancia negra a través de una cánula de inyección, que se coloca en posición con la ayuda de una cánula guía fijada al cráneo. Los electrodos de referencia y auxiliar (no ilustrados) se sitúan subcutáneamente a través de una incisión practicada en la piel del cuello.

El DOPAC se midió en el modo de voltametría de pulso diferencial con los mismos parámetros utilizados durante la calibración *in vitro*. Una vez obtenida la señal de DOPAC, se efectuaron registros cada 2.5 minutos hasta que la altura del pico tuvo variaciones menores del 10 %. Normalmente, el tiempo necesario para la estabilización de la señal de DOPAC fué de 90 minutos. A partir de este momento se tomó un registro basal de 40 minutos antes de efectuar las manipulaciones farmacológicas. Para evitar grandes fluctuaciones de la señal, la temperatura rectal de los animales se mantuvo entre 37 y 38 °C durante todo el experimento.

Nosotros hemos observado que la señal de DOPAC comienza a disminuir aproximadamente cuatro horas después de iniciado el registro basal. Es posible que esta reducción se deba a una pérdida gradual de la sensibilidad, que se ha observado con esta clase de electrodos (Marsden y cols., 1988). Sin embargo, tampoco podemos descartar que la reducción de la señal se deba a una reducción real de la concentración de DOPAC como consecuencia del período prolongado de anestesia.

#### **F) Medición de dopamina en el neocórtico**

La dopamina se midió en el neocórtico de ratas en las cuales

se inhibió la formación de DOPAC mediante la administración de pargilina (37.5 mg/Kg i.p.) una hora antes de implantar los electrodos. Aunque esta dosis equivale a la mitad de la reportada (Gonon y cols., 1984; Gonon y Buda, 1985), nosotros hemos encontrado que es suficiente para eliminar totalmente la señal de DOPAC en el período de una hora. Más aún, con esta dosis de pargilina, la vida media con la cual desaparece el DOPAC (11.6 ± 1.4 min; n = 3) es muy semejante a la que se ha observado (9.2 ± 0.2 min; n = 8) con la dosis de 75 mg/Kg (Gonon y cols., 1981b).

Para registrar la señal de oxidación de la dopamina, los electrodos fueron implantados en las mismas coordenadas utilizadas para registrar el DOPAC y se utilizó el modo de voltametría de pulso normal diferencial, con los mismos parámetros empleados durante la calibración *in vitro*. Los registros se efectuaron cada 2.5 minutos hasta que la señal se estabilizó (normalmente 30 minutos). A diferencia del DOPAC, la señal de oxidación de la dopamina tuvo más fluctuaciones en condiciones basales (± 30 %) y también después de administrar fisostigmina. Otro aspecto importante fué que la sensibilidad de los electrodos a la dopamina se perdió totalmente después de tres horas de registro, de manera similar a lo reportado (Gonon, 1987).

### G) Implantación de las cánulas

A aquellos animales a los cuales se les administraron drogas directamente en la substancia *nigra* o en el núcleo pedunculopontino, se les implantó una cánula metálica de 12.5 mm de longitud y 0.45 mm de diámetro externo, que sirvió como guía para introducir una cánula de inyección a través de la cual se aplicaron los fármacos (ver la figura 8). Para tal efecto, las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral (300 mg/Kg i.p.) y colocadas en un aparato estereotáxico, con la barra de los incisivos situada también a 3.3 mm por debajo del nivel de las barras auriculares. La punta de la cánula guía se situó a 2 mm por arriba de la substancia *nigra* del lado derecho, en las siguientes coordenadas: con referencia a bregma: AP = -5.2 mm y ML = -2.1 mm y con referencia a la superficie de la corteza cerebral, DV = -4.9 mm. En el caso del núcleo pedunculopontino las coordenadas fueron: con referencia a bregma, AP = -8 mm y ML = -2.1 mm, y con referencia a la superficie de la corteza cerebral, DV = -6.5 mm. Una vez implantada, se esperaron por lo menos siete días para que los animales se recuperaran del trauma quirúrgico antes de efectuar los experimentos de voltametría.

## H) Histología

Al finalizar cada experimento, se produjo una lesión electrofónica en el sitio de registro mediante la aplicación de pulsos triangulares de 0 a 3 V, con una frecuencia de 70 Hz, una intensidad de 0.125  $\mu$ A y una duración de 60 a 90 segundos. Posteriormente las ratas fueron perfundidas por vía intracardiaca con 20 ml de solución salina isotónica (NaCl, 0.9 %), seguidos de 80 ml de amortiguador de fosfatos (pH = 7.4) con formaldehído al 10%. La fijación de los cerebros se completó sumergiéndolos en esta misma solución durante varios días, antes de efectuar cortes coronales de 60  $\mu$ m con un vibratomo. Los cortes fueron montados en láminas portaobjetos con la ayuda de una solución de gelatina al 0.2 % y etanol al 40 %. Después de varios días, los cortes fueron teñidos con violeta de cresilo (tinción de Nissl) y se identificó el sitio del neocórtico en donde se registró el DOPAC, así como la región de la sustancia *nigra* y el núcleo pedunculopontino en donde se administraron los fármacos. Con el propósito de localizar con mayor precisión los sitios de aplicación de los fármacos, se hicieron reconstrucciones seriadas de ambos núcleos, con la ayuda de dibujos de los cortes histológicos. Los sitios de inyección reportados en la sección de Resultados se ilustran sobre diagramas del atlas de Paxinos y Watson (1982).

## I) Drogas

Las siguientes sustancias fueron obtenidas de la compañía Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, U.S.A.): sulfato de fisostigmina, bromhidrato de escopolamina, clorhidrato de mecamilamina, clorhidrato de di-muscarina y gamma-butirolactona. El biclorhidrato de pirenzepina (compuesto L-S 519) y el compuesto AF-DX 116 fueron un donativo de la compañía farmacéutica Dr. Karl Thomae GmbH (República Federal de Alemania). En todos los casos las dosis se calcularon con respecto a la base libre de la droga.

## J) Análisis estadístico

La prueba U de Mann-Whitney se usó para comparar los cambios en la concentración de DOPAC producidos por los fármacos entre grupos experimentales independientes, cuando la prueba F de Snedecor reveló que las varianzas no eran homogéneas (Downie y Heath, 1970). Para analizar el curso temporal del efecto de la fisostigmina aplicada por vía sistémica o local, se usó la prueba t de Student para datos correlacionados (pareados). Todos los valores reportados corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar.

## V. RESULTADOS

### A) Efecto de la fisostigmina aplicada por vía sistémica sobre la concentración de dopamina y DOPAC en el neocstriado de la rata anestesiada

Inicialmente se estudió el efecto de la fisostigmina aplicada por vía sistémica, para determinar si la acetilcolina endógena liberada espontáneamente podría modificar la concentración de DOPAC y dopamina en el neocstriado. La administración de fisostigmina (0.5  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ ) por vía subcutánea causó un rápido incremento en la concentración de DOPAC extracelular en el neocstriado (ver la figura 9). El incremento fue significativo 10 minutos después de la administración de la droga, alcanzó su efecto máximo a los 72 minutos y dejó de ser significativo a los 150 minutos ( $P < 0.05$  comparándolo con la corriente de oxidación en el tiempo cero;  $t$  de Student pareada). El efecto de la fisostigmina se bloqueó totalmente con escopolamina (5 mg/Kg, i.p.) administrada 40 minutos antes (ver la figura 10). La escopolamina administrada en esta dosis, por sí sola no modificó la concentración basal de DOPAC en el neocstriado.

Un efecto semejante se obtuvo mediante la administración de fisostigmina (0.5  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ ) por vía sistémica, sobre la concentración extracelular de dopamina en el neocstriado de ratas

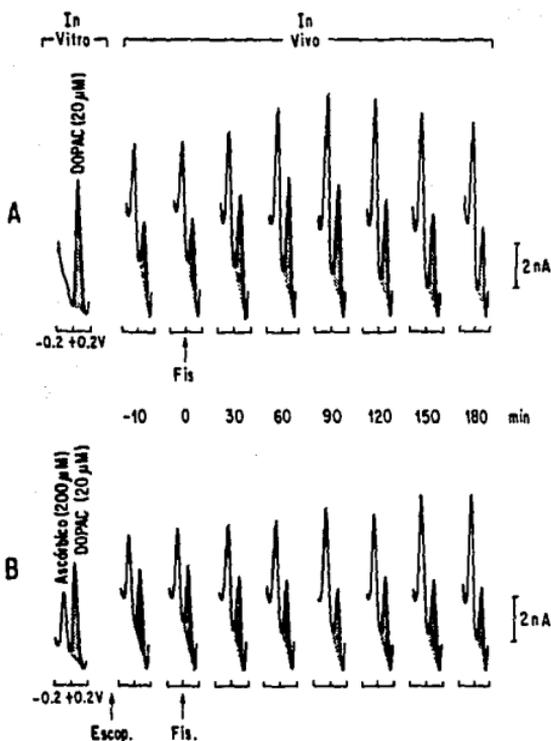
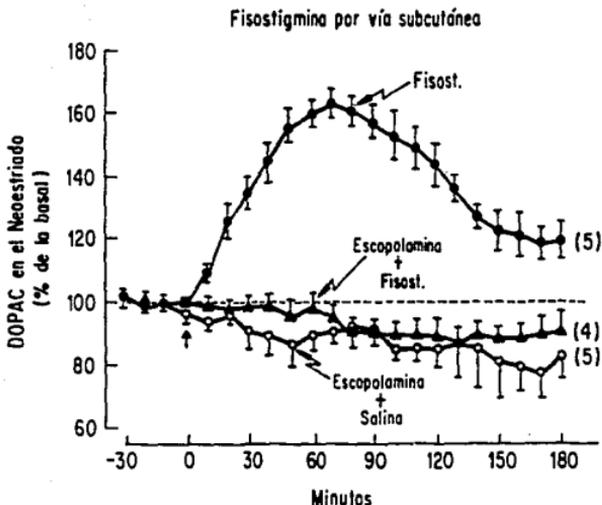


FIGURA 9

Registros voltamétricos del ácido ascórbico y el DOPAC en el neostriado de la rata anestesiada

Efecto de la fisostigmina y su bloqueo con escopolamina

El DOPAC (area sombreada) y el ácido ascórbico se midieron con el método de voltametría de pulso diferencial. Los electrodos fueron calibrados *in vitro* antes de implantarlos en el neostriado derecho. A) Registros voltamétricos en una rata a la cual se le administró fisostigmina (Fis, 0.5 mg/kg) por vía subcutánea. B) Registros voltamétricos en una rata que fue tratada con escopolamina (Escop., 5 mg/kg, i.p.) cuarenta minutos antes de administrar la fisostigmina. La escala de tiempo (min) es igual para A y B.



**FIGURA 10**

**Efecto de la fisostigmina aplicada por vía sistémica sobre la concentración de DOPAC en el neocstriado de la rata anestesiada**

El DOPAC se registró con la técnica de voltametría de pulso diferencial. Los electrodos, con fibras de carbono de  $\approx 500 \mu\text{m}$  de longitud, fueron implantados en el neocstriado derecho de ratas anestesiadas con hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.). Después de tomar un registro basal, a un grupo de animales se les administró fisostigmina (0.5 mg/Kg, s.c.) en el minuto cero, señalado por la flecha. A los otros dos grupos se les administró escopolamina (5 mg/Kg, i.p.) cuarenta minutos antes que la fisostigmina o el vehículo (solución de NaCl al 0.9%, 1 ml/Kg, s.c.). La concentración basal media de DOPAC en los grupos experimentales fué: fisostigmina ( $\bullet$ ),  $13.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ); escopolamina + fisostigmina ( $\blacktriangle$ ),  $15.3 \pm 1.8 \mu\text{M}$  ( $n = 4$ ); escopolamina + salina ( $\circ$ ),  $19.2 \pm 1.9 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ). Los resultados se expresan como porcentaje del promedio de la altura de la señal de DOPAC de los diez registros previos a la administración de fisostigmina o solución salina. Los puntos representan la media  $\pm$  el error estándar del número de experimentos indicados entre paréntesis.

tratadas con pargilina (37.5 mg/Kg i.p.) una hora antes. El efecto máximo en la concentración de dopamina se alcanzó más rápidamente y tuvo una duración menor en comparación con los cambios en la concentración de DOPAC (ver la figura 11).

**B) Efecto de la fisostigmina aplicada en la substancia *nigra* sobre la concentración de DOPAC en el neocstriado**

La administración de la fisostigmina por vía sistémica no permite saber a qué nivel del sistema nigroestriatal ejerce su efecto la acetilcolina. Esta podría estar actuando directamente sobre las neuronas dopaminérgicas en la substancia *nigra* o bien sobre la terminal dopaminérgica en el neocstriado, incrementando en ambos la concentración de DOPAC en el neocstriado. Por tanto era necesario administrar la fisostigmina localmente en la substancia *nigra*. En la rata anestesiada, la fisostigmina (0.75  $\mu$ g de base libre) aplicada en la substancia *nigra* causó un incremento de la concentración de DOPAC en el neocstriado ipsilateral (ver la figura 12). Cuando la cánula de inyección se encontró en la vecindad de la SNC la magnitud del efecto fué mayor que cuando se hallaba más distante (ver la figura 13). En el primer caso el efecto fué significativo desde los 10 minutos de iniciada la administración de fisostigmina, alcanzó su efecto máximo a los 30 minutos, y dejó de ser significativo a los 130 minutos ( $P < 0.05$

## Fisostigmina por vía subcutánea

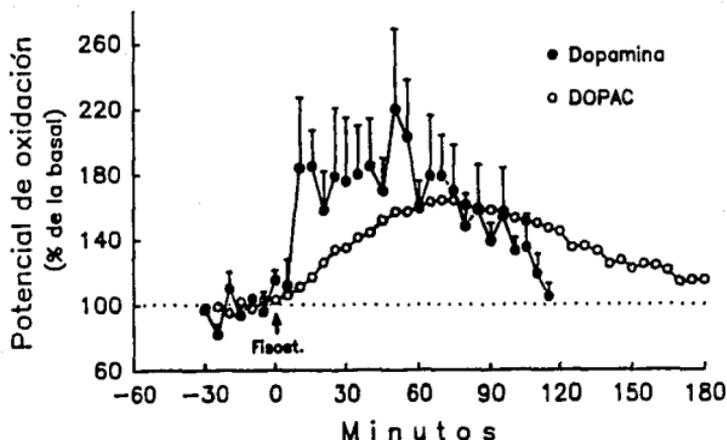
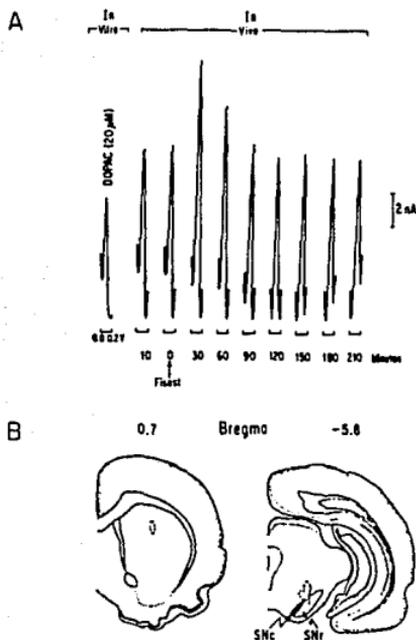


Figura 11

**Efecto de la fisostigmina aplicada por vía sistémica sobre la concentración de dopamina en el neostriado de la rata anestesiada**

### **Comparación con el curso temporal de la señal de DOPAC**

La dopamina se registró con la técnica de voltametría de pulso normal diferencial. Los electrodos de fibra de carbono fueron implantados en el neostriado derecho de ratas anestesiadas con hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.). Una hora antes de iniciar los registros, los animales fueron tratados con pargilina (37.5 mg/Kg i.p.), para inhibir la formación de DOPAC. La concentración basal de dopamina, calculada a partir de la calibración *in vitro*, fué de  $24 \pm 10$  nM ( $n = 4$ ). Después de tomar un registro basal se administró la fisostigmina (Fisost., 0.5 mg/Kg) por vía subcutánea. Los resultados se expresan como porcentaje del promedio de la señal de dopamina del registro basal. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar del número de experimentos indicado entre paréntesis. Los datos de la curva de DOPAC son los mismos que los de la figura 10 y fueron obtenidos en otro grupo de animales.



**FIGURA 12**

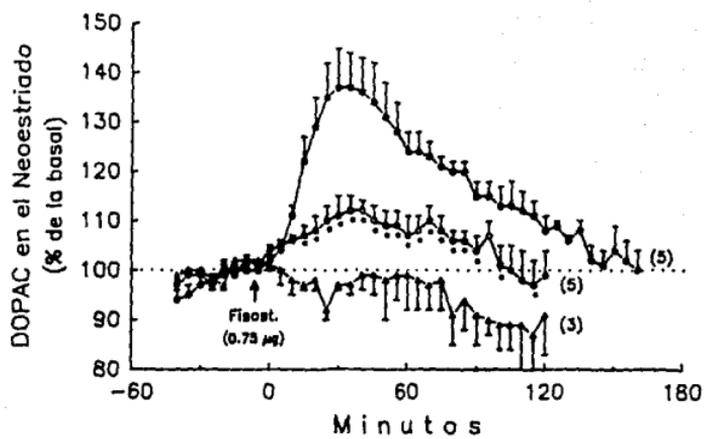
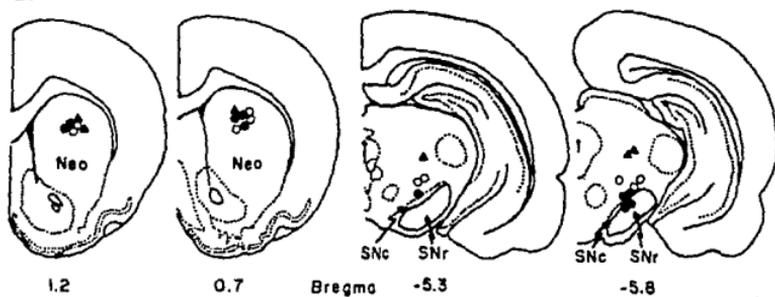
**Registros voltamétricos del DOPAC en el neocstriado durante la inhibición de las AChEs en la substancia negra**

El DOPAC se midió con la técnica de voltametría de pulso diferencial en la zona delimitada con una línea discontinua en el diagrama del neocstriado derecho (Bregma, 0.7 mm). En estos registros no se ilustra la señal del ácido ascórbico. En el minuto cero se administraron 0.75  $\mu$ g de fisostigmina en la zona delimitada por una línea discontinua en el diagrama de la substancia negra (Bregma, -5.6 mm). SNc = *pars compacta*; SNr = *pars reticulata*.

### Figura 13

#### Efecto de la fisostigmina aplicada en la sustancia *nigra* sobre la concentración de DOPAC en el neostriado de la rata anestesiada

El DOPAC se registró con la técnica de voltametría de pulso diferencial. Los electrodos de fibra de carbono fueron implantados en el neostriado derecho de ratas anestesiadas con hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.). A) después de tomar un registro basal, a un primer grupo de animales (●) se les administró, a través de una cánula metálica, 0.75  $\mu$ g de fisostigmina disueltos en 0.5  $\mu$ l de solución salina (pH, 7.4), en un periodo de 5 minutos en la sustancia *nigra* ipsilateral cerca de la *pars compacta*. A un segundo grupo (○) se les aplicó la misma dosis de fisostigmina pero a  $\approx$  500  $\mu$ m de distancia de la sustancia *nigra*. Al tercer grupo (▲) se les administró la fisostigmina 1 mm por arriba de la sustancia *nigra*. El promedio de la concentración basal de DOPAC de los grupos fué: (●), 40  $\pm$  7  $\mu$ M (n = 5); (○), 29  $\pm$  3 (n = 5); (▲), 27  $\pm$  1, (n = 3). Los resultados se expresan como porcentaje del promedio de la altura de la señal de DOPAC de los 17 registros previos a la administración de la fisostigmina. Los puntos representan la media  $\pm$  el error estándar del número de experimentos señalado entre paréntesis. B) Diagramas del atlas de Paxinos y Watson (1982) en donde se indican con símbolos los sitios de registro del DOPAC en el neostriado (Bregma, 1.2 y 0.7 mm) y los sitios de aplicación de la fisostigmina en la sustancia *nigra* (Bregma, -5.3 y -5.8 mm). SNC : *pars compacta*; SNr : *pars reticulata*.

**A****B**

comparándolo con la corriente de oxidación en el tiempo cero; t de Student pareada. Al comparar los tres grupos experimentales se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con la prueba U de Mann-Whitney. En la figura 13, los asteriscos indican los valores donde se encontraron diferencias significativas al comparar el grupo en el que se observó un efecto máximo en la concentración de DOPAC con aquel en el cual se observó un efecto parcial.

**C) Efecto de la di-muscarina aplicada en la sustancia *nigra* sobre la concentración de DOPAC en el neostriado**

El efecto de la fisostigmina administrada localmente en la sustancia *nigra* sugiere que la acetilcolina endógena liberada espontáneamente a este nivel podría estar regulando la actividad del sistema dopaminérgico nigroestriatal y se optó por un estudio farmacológico para determinar qué tipo de receptor podría estar mediando el efecto de la acetilcolina. La administración del agonista muscarínico, di-muscarina (0.5  $\mu\text{g}$  de base libre) en la sustancia *nigra* de la rata anestesiada causó un incremento de la concentración de DOPAC en el neostriado ipsilateral (ver la figura 14). Este efecto fué significativo desde los 20 minutos de iniciada la administración de la di-muscarina y alcanzó su máximo

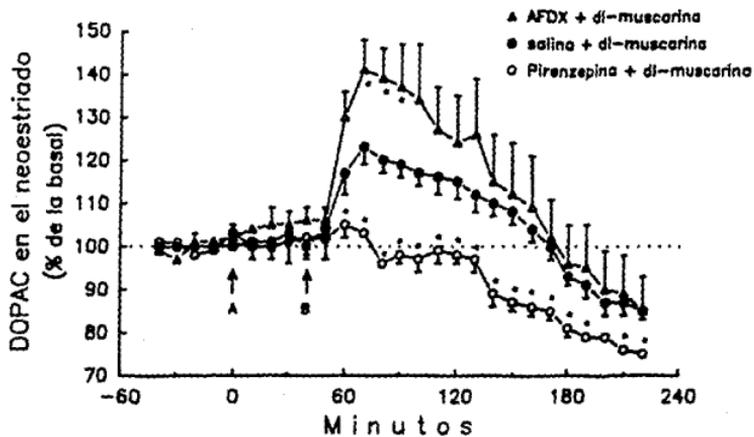
Figura 14

**Efecto de la dl-muscarina aplicada en la substancia *nigra* sobre la concentración de DOPAC en el neostriado de la rata anestesiada**

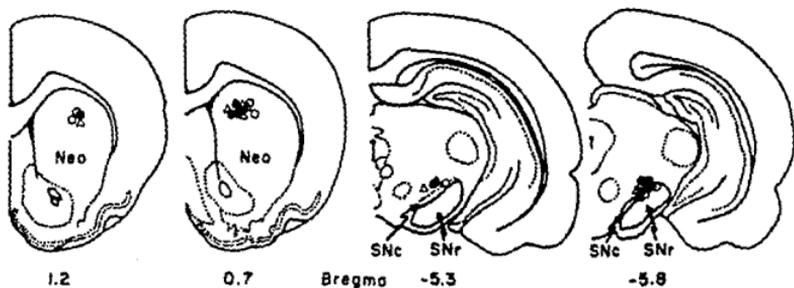
El DOPAC se registró con la técnica de voltametría de pulso diferencial. Los electrodos de fibra de carbono fueron implantados en el neostriado derecho de ratas anestesiadas con hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.). A) Después de tomar un registro basal, los fármacos fueron aplicados directamente en la substancia *nigra*, disueltos en 0.5  $\mu$ l de solución salina (pH 7.4), en un periodo de 5 minutos. Al primer grupo de animales (●) se les administró inicialmente 0.5  $\mu$ l de solución salina y 40 minutos después, dl-muscarina (0.5  $\mu$ g, base libre). Al segundo grupo (○) se les administró pirenzepina (1  $\mu$ g, base libre) y 40 minutos después, pirenzepina (1  $\mu$ g) + dl-muscarina (0.5  $\mu$ g). Al tercer grupo ( $\Delta$ ) se les aplicó AF DX-116 (1  $\mu$ g, base libre) y 40 minutos después AF DX-116 + dl-muscarina (0.5  $\mu$ g). La concentración basal media de DOPAC en los grupos experimentales fue: salina + dl-muscarina,  $21 \pm 2 \mu$ M (n = 5); pirenzepina + dl-muscarina,  $20 \pm 3 \mu$ M (n = 4); AF DX-116 + dl-muscarina,  $23 \pm 4 \mu$ M (n = 4). Los resultados se expresan como porcentaje del promedio de la altura de la señal de DOPAC de los 17 registros previos a la primera administración (A). Los puntos representan la media  $\pm$  el error estándar del número de experimentos realizados en cada grupo. B) Diagramas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1982) en donde se indican con símbolos los sitios del neostriado (Neo) en donde se registró el DOPAC (bregma, 0.7 y 1.2 mm), así como los sitios de la substancia *nigra* en donde se aplicaron los fármacos (bregma, -5.3 y -5.6). SNC = substancia *nigra* compacta; SNr = substancia *nigra* reticulada.

A

di-Muscarina en la sustancia negra



B



valor a los 30 minutos (123 ± 4 %). El efecto de la di-muscarina se bloqueó totalmente con pirenzepina (1 µg), un antagonista muscarínico M<sub>1</sub>, el cual por sí solo no modificó los niveles basales de DOPAC en el neocortículo. En cambio, el compuesto AF-DX 116, un antagonista muscarínico M<sub>2</sub>, no bloqueó el efecto de la di-muscarina administrada en la sustancia *nigra*. Con el propósito de comparar potencias, las dosis de pirenzepina y AF-DX 116 fueron equimolares. En la figura 14, los asteriscos indican los valores en donde se encontraron diferencias significativas (P 0.05), al comparar el grupo en el cual se administró solución salina + di-muscarina contra los dos grupos restantes (prueba U de Mann-Whitney).

En la figura 15 se muestra el resultado de un experimento individual en el cual puede observarse que la aplicación del compuesto McN-A-343 (un agonista selectivo M<sub>1</sub>) en la sustancia *nigra*, mimetizó el efecto de la di-muscarina aplicada previamente. Este resultado refuerza la hipótesis de que el subtipo de receptor muscarínico que está mediando el incremento de la actividad de la vía nigroestriatal, es el M<sub>1</sub>. La diferencia en la magnitud del efecto producido por la di-muscarina y por el McN-A-343 puede deberse a una diferencia en la potencia de los fármacos, o bien, al hecho de el tiempo de registro transcurrido pudo haber causado una desensibilización del electrodo.

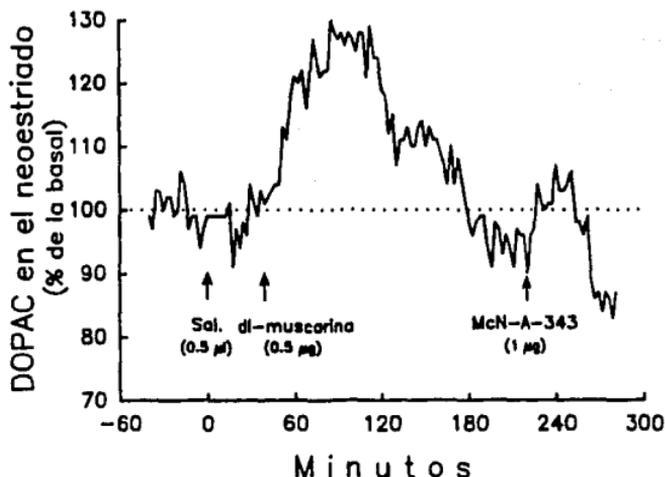


Figura 15

**Efecto del compuesto McN-A-343 aplicado en la sustancia *nigra*, sobre la concentración de DOPAC en el neostriado**

Esta gráfica representa un experimento individual en el cual el DOPAC se registró con la técnica de voltametría de pulso diferencial. El electrodo de fibra de carbón fué implantado en el neostriado derecho de una rata anestesiada con hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.). Después de tomar un registro basal de cuarenta minutos, se administraron 0.5 µl de solución salina en el tiempo cero. Cuarenta minutos después se aplicaron 0.5 µg de di-muscarina y tres horas más tarde 1 µg del compuesto McN-A-343, un agonista M<sub>1</sub>. Tanto la solución salina como los fármacos fueron administrados en la sustancia *nigra* ipsilateral. Estos últimos fueron disueltos en 0.5 µl de solución salina (pH = 7.4) y aplicados durante un periodo de 5 minutos. La concentración basal media de DOPAC fué de 17 µM.

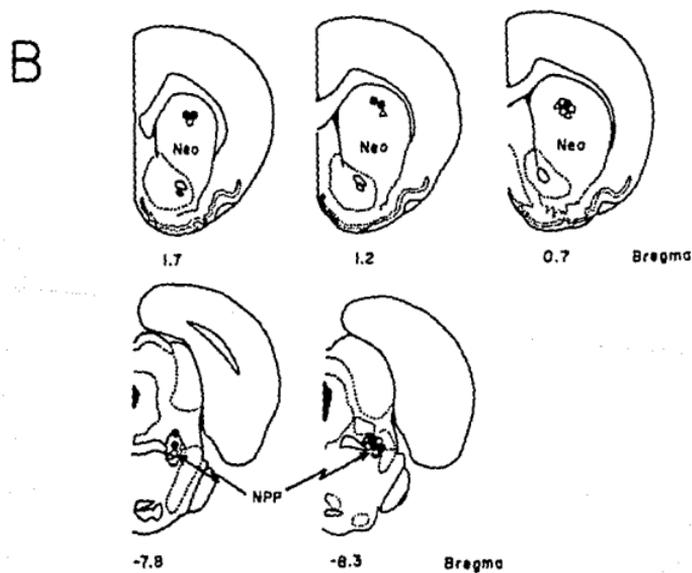
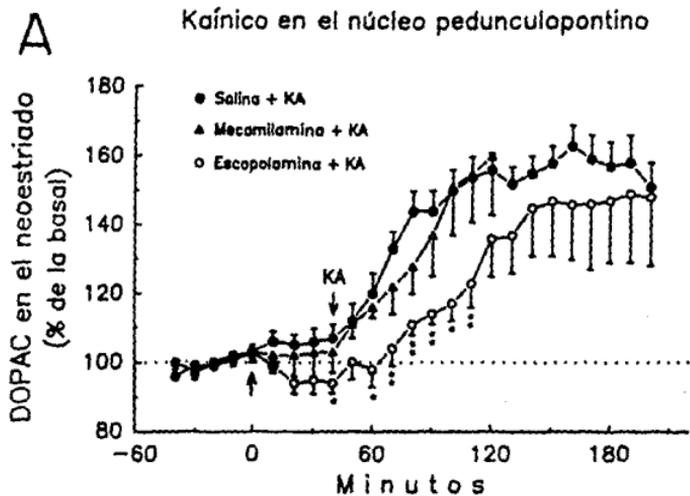
**D) Efecto del ácido kaínico aplicado en el núcleo pedunculopontino sobre la concentración de DOPAC en el neocóstriado**

La aplicación de ácido kaínico (0.5 µg) en la región del núcleo pedunculopontino causó un rápido incremento en la concentración de DOPAC en el neocóstriado, alcanzando el efecto máximo (163 ± 6 %) a los 120 minutos de su aplicación (ver la figura 16). Este efecto fue bloqueado parcialmente con el antagonista muscarínico, escopolamina (5 mg/Kg i.p.), administrada 40 minutos antes de aplicar el ácido kaínico. El efecto de bloqueo dejó de ser significativo a los 70 minutos. Por otro lado, el antagonista nicotínico mecamilamina (4 mg/Kg, i.p.) no inhibió el efecto del ácido kaínico. En la figura 16, los asteriscos señalan los valores en los cuales se encontraron diferencias significativas al comparar el grupo al cual se administró solución salina + ácido kaínico con los dos grupos restantes (prueba U de Mann-Whitney).

### Figura 16

#### Efecto del ácido kaínico aplicado en el núcleo pedunculopontino sobre la concentración de DOPAC en el neocóstriado de la rata anestesiada

El DOPAC se registró con la técnica de voltametría de pulso diferencial. Los electrodos de fibra de carbono fueron implantados en el neocóstriado derecho de ratas anestesiadas con hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.). A) Después de tomar un registro basal, a un primer grupo de animales (●) se les administró, en el tiempo cero, 0.5  $\mu$ l de solución salina y 40 minutos después, 0.5  $\mu$ g de ácido kaínico disueltos en 0.5  $\mu$ l de solución salina (pH 7.4) sobre el núcleo pedunculopontino, durante un periodo de 5 minutos. Al segundo grupo (○) se les aplicó escopolamina (5 mg/Kg, i.p.) 40 minutos antes de la administración del kaínato. Al tercer grupo ( $\Delta$ ) se les administró mecamilamina (4 mg/Kg, i.p.) 40 minutos antes de la administración del kaínato. La concentración basal media de DOPAC en los grupos experimentales fué: ácido kaínico,  $35 \pm 2 \mu$ M (n = 5); escopolamina + ácido kaínico,  $18 \pm 2 \mu$ M (n = 4); mecamilamina + ácido kaínico,  $28 \pm 7 \mu$ M (n = 3). Los resultados se expresan como promedio de la altura de la señal de DOPAC de los 17 registros previos a la primera administración (○). Los puntos representan la media  $\pm$  el error estándar del número de experimentos realizados en cada grupo. B) Diagramas del atlas de Paxinos y Watson (1982) en donde se indican los sitios de registro del DOPAC en el neocóstriado (Bregma, 1.7, 1.2 y 0.7) y los sitios de aplicación del ácido kaínico en el núcleo pedunculopontino (Bregma -7.8 y -8.3).



**E) Efectos del haloperidol y la gamma-butirolactona administrados sistemicamente sobre la concentración de DOPAC en el neocstriado**

La administración de haloperidol (0.25 mg/Kg) por vía intraperitoneal, causó un rápido incremento en los niveles de DOPAC en el neocstriado (ver la figura 17), alcanzando un valor de  $242 \pm 12 \%$  a los 60 minutos. Por otra parte, la gamma-butirolactona (700 mg/Kg), administrada por vía intraperitoneal causó un decremento en los niveles de DOPAC en el neocstriado, que alcanzó un mínimo de  $51 \pm 8 \%$  cuarenta minutos después de su aplicación.

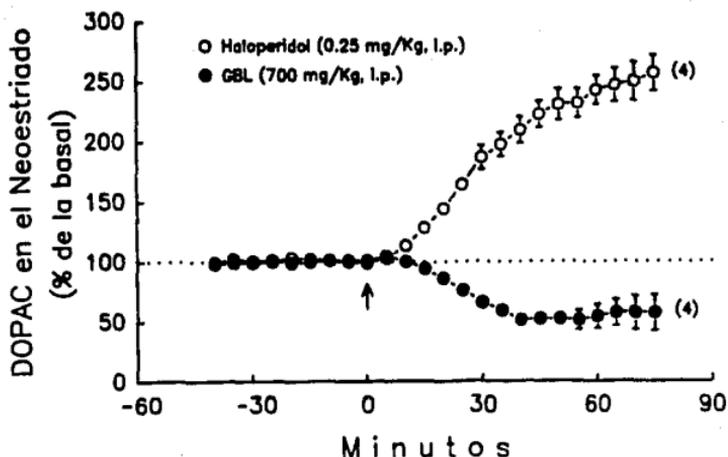


Figura 17

**Efectos del haloperidol y la gamma-butirolactona sobre la concentración de DOPAC en el neostriado**

El DOPAC se registró con la técnica de voltametría de pulso diferencial. Los electrodos de fibra de carbono fueron implantados en el neostriado derecho de ratas anestesiadas con hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.). Después de tomar un registro basal, a un primer grupo de animales (O) se les administró haloperidol (0.25 mg/Kg, i.p.) en el tiempo cero. El segundo grupo (●) fué tratado con gamma-butirolactona (700 mg/Kg, i.p.). La concentración basal media de DOPAC en los grupos experimentales fué: haloperidol,  $10 \pm 5 \mu\text{M}$  (n = 4); gamma-butirolactona,  $23 \pm 5 \mu\text{M}$  (n = 4). Los resultados se expresan como promedio de la altura de la señal de DOPAC de los 17 registros previos a la administración de los fármacos. Los puntos representan la media  $\pm$  el error estándar del número de experimentos señalados entre paréntesis.

## VI. DISCUSION

### A) Ventajas y limitaciones de la técnica de voltametría de pulso diferencial

Las principales ventajas de la técnica de voltametría de pulso diferencial son: su mayor sensibilidad respecto de otras técnicas electroquímicas (Narsden y cols., 1988), y el hecho de que los electrodos de fibra de carbón empleados producen un daño mínimo en el tejido cerebral, ya que el tamaño de la fibra es muy pequeño. Ahora bien, la limitación más seria que se tiene al utilizar esta técnica, es la imposibilidad de discriminar las señales de oxidación de compuestos que, por su semejanza estructural, tienen potenciales de oxidación muy cercanos. Tal es el caso de la dopamina y su metabolito inmediato en el neocórtex, el DOPAC (Gonon y cols., 1980, 1984). La concentración extracelular de dopamina en el neocórtex, en condiciones normales, es muy baja debido al eficiente sistema de recaptura situado en las terminales dopaminérgicas. Utilizando el método de microdialísis se ha calculado que la concentración basal de dopamina en el neocórtex de ratas despiertas es de aproximadamente 54 nM, mientras que la concentración de DOPAC es aproximadamente 5  $\mu$ M (Ungerstedt, 1984). Por esta razón, cuando se registra la corriente de oxidación de

los catecoles en el neoestriado, la mayor contribución es del DOPAC (> 98 %). Una forma de registrar la corriente de oxidación de dopamina es administrar inhibidores de la enzima monoaminoxidasa, tales como la pargilina, con el objeto de impedir la formación de DOPAC. Utilizando esta maniobra farmacológica en combinación con la técnica de voltametría de pulso normal diferencial, se ha calculado que la concentración basal extracelular de dopamina en el neoestriado de ratas anestesiadas se halla entre 15 y 25 nM (Gonon y cols., 1985). Por otra parte, con la voltametría de pulso diferencial se ha calculado que la concentración extracelular de DOPAC en el neoestriado se halla entre 17 y 22  $\mu$ M (Gonon y cols., 1980), es decir, mil veces mayor que la concentración de dopamina.

En este trabajo, la medición sistemática de dopamina en el neoestriado no fué posible debido a que en muchos casos no se lograron detectar los niveles basales de dopamina aún inhibiendo la formación de DOPAC con pargilina. En cambio se registraron los cambios en la concentración de DOPAC en el neoestriado con el objetivo de estudiar los efectos de las manipulaciones farmacológicas de la vía colinérgica sobre la actividad del sistema dopaminérgico nigroestriatal. Es posible que en el futuro logremos detectar la señal de oxidación de la dopamina utilizando electrodos de 40  $\mu$ m de diámetro tratados con Nafión, un polímero de carga negativa que, al fijarse en la superficie electroactiva

de la fibra de carbono del electrodo, rechaza las moléculas de DOPAC cargadas electronegativamente y atrae las moléculas de carga electropositiva de la dopamina, favoreciendo la detección de la señal de oxidación de ésta última (Brazell y cols., 1987).

### **B) El DOPAC como índice de la actividad de las neuronas dopaminérgicas**

Uno de los puntos más críticos en este trabajo es la utilización del DOPAC como índice de la concentración de dopamina extracelular. En trabajos previos ya se ha reportado que si bien, el aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas está siempre asociado con un incremento en la concentración de DOPAC en el neocórtex, lo inverso no es necesariamente cierto (Commissioing, 1985). Sin embargo, en los experimentos preliminares de este estudio se observó que el haloperidol, un antagonista de los receptores dopaminérgicos, administrado por vía sistémica causó un incremento en la concentración de DOPAC en el neocórtex. Se sabe que el haloperidol incrementa el disparo de las neuronas dopaminérgicas de la SN (Bunney y cols., 1973; Bunney y Aghajanian, 1975) y por tanto estos resultados apoyan la hipótesis de que un aumento en la liberación de dopamina produce un incremento en la concentración

de DOPAC extracelular. Complementariamente, la administración sistémica de gamma-butirolactona, un compuesto que inhibe el disparo de las neuronas dopaminérgicas (Harris y cols., 1989), causó un decremento en la concentración de DOPAC en el neocóstriado y este resultado es compatible con los obtenidos en un estudio de microdialisis en el cual se observó que la gamma-butirolactona administrada por vía intraperitoneal redujo los niveles de dopamina y de DOPAC en el neocóstriado (Imperato y DiChiara, 1984). Esto último también sugiere que un decremento en la concentración del DOPAC extracelular puede estar asociado con un decremento en la liberación de dopamina. Sin embargo, debido a la controversia en este punto, los resultados deben ser interpretados cautelosamente y más que considerar los cambios en la concentración de DOPAC como un índice de la liberación de dopamina, nosotros los hemos interpretado como un cambio en la actividad de las neuronas dopaminérgicas.

Otro punto que merece considerarse es el de los posibles efectos de la anestesia sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas. Se ha observado que el hidrato de cloral aumenta la concentración extracelular de DOPAC en el neocóstriado de ratas con libre movimiento, medido con el método de voltametría de pulso diferencial (Gonon y cols., 1981). Puesto que se ha reportado que este anestésico también incrementa el disparo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Bunney y Aghajanian, 1975), es

posible que su efecto sobre la concentración de DOPAC se deba a un incremento en la liberación de dopamina. Así, aunque es probable que en nuestros experimentos los niveles basales de DOPAC estuviesen aumentados, nosotros observamos muy poca variabilidad en los registros basales obtenidos durante 40 minutos (< 10 %), y no se observaron cambios importantes en la señal, consecutivos a la administración periódica del anestésico durante los registros.

**C) Evidencias de que la acetilcolina endógena puede modular la liberación y el recambio de la dopamina en el neocortico**

La fisostigmina aplicada por vía subcutánea (0.5 mg/Kg) causó un incremento, tanto en la concentración de DOPAC como de dopamina en el neocortico. El interés principal en esta primera serie experimental fué comparar el curso temporal del incremento de la dopamina con el de su metabolito. Como puede observarse en la figura 11, el incremento máximo en la concentración de dopamina se alcanzó más rápidamente que la del DOPAC pero su duración fue menor (≈ 90 min.). También se observaron fluctuaciones en la concentración de dopamina durante el efecto del fármaco, y posible que se deban a un mecanismo de retroalimentación mediado por la vía GABAérgica estriado-nigral que llega a la *pars compacta* y que eventualmente podría ejercer un efecto inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgicas (Grace y Bunney, 1985). El incremento de

la señal de dopamina consecutivo a la aplicación de fisostigmina pudo deberse a dos causas: un aumento en la frecuencia de disparo inducido por la acetilcolina endógena a nivel del soma de las neuronas dopaminérgicas (Lichtensteiger y cols., 1976), o bien, al efecto directo de la acetilcolina liberada por las interneuronas del neocestriado sobre las terminales dopaminérgicas, que se sabe tienen receptores muscarínicos cuya activación facilita la liberación de dopamina (Bonanno y cols., 1965; Marchi y cols., 1965).

El incremento en la concentración extracelular de DOPAC duró más tiempo ( $\approx$  150 min.) y fué significativo ( $\approx$  160 %), semejante al efecto reportado utilizando la técnica de microdiálisis ( $\approx$  140 %), en ratas despiertas a las cuales se les administró una dosis mayor de fisostigmina (1.2 mg/Kg) por vía intraperitoneal (Damsma, 1988). El hecho de que el efecto de la fisostigmina sobre la concentración de DOPAC pudiera bloquearse con escopolamina (ver la figura 10) sugiere que la acetilcolina endógena estimuló el recambio de dopamina activando receptores de tipo muscarínico. Sin embargo, estos resultados no permitían saber si este efecto se ejerce a nivel de la terminal dopaminérgica, a nivel del soma en la SNc o bien a través de la activación de otras vías neuronales. Por esta razón procedimos a administrar la fisostigmina localmente en la sustancia *nigra* para estudiar el efecto sobre el recambio de la dopamina en el neocestriado.

**D) Evidencias de la existencia de una vía colinérgica a la  
substancia nigra compacta**

La inhibición de las acetilcolinesterasas mediante la aplicación local de fisostigmina en la SN produjo un rápido incremento en la concentración de DOPAC en el neostriado ipsilateral (ver la figura 13). Este incremento fué más significativo en los casos en que la cánula de inyección se encontraba en la vecindad de la SNC, lo cual sugiere que existen terminales colinérgicas en la substancia nigra que están acopladas funcionalmente a las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Estas terminales colinérgicas aparentemente regulan la actividad de la vía dopaminérgica nigroestriatal, pero nuestros datos no permiten saber si el incremento en la concentración de DOPAC en el neostriado se debe a una mayor liberación de dopamina en la terminal, como resultado de un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas, o bien, se debe a otro mecanismo desconocido. Sin embargo, los resultados obtenidos constituyen un respaldo funcional a los estudios morfológicos que confirman la existencia de terminales inmunoreactivas a la acetiltransferasa de colina en la *pars compacta* de la substancia nigra (Beninato y Spencer, 1988; Gould y cols., 1989), así como también a la observación de que estas terminales establecen contactos sinápticos con dendritas similares a las de las neuronas

dopaminérgicas (Martínez-Murillo y cols., 1989).

**E) Evidencias de que la acetilcolina activa receptores muscarínicos  $M_1$  en la sustancia nigra**

La administración de di-muscarina en la sustancia nigra mimetizó el efecto de la fisostigmina, lo cual sugiere que la acetilcolina endógena liberada espontáneamente, activa receptores de tipo muscarínico localizados probablemente en los somas de las neuronas dopaminérgicas. El hecho de que este efecto pudiese bloquearse con pirenzepina, sugiere que está mediado por receptores muscarínicos del subtipo  $M_1$  (Hammer y cols., 1980; Giraldo y cols., 1985). En cambio el compuesto AF-DX 116, un antagonista muscarínico del subtipo  $M_2$  (Hammer y cols., 1986; Giachetti y cols., 1986), no solo no inhibe el efecto de la di-muscarina, sino que parece potenciarlo. Es importante mencionar aquí que en la terminal dopaminérgica también se localizan receptores muscarínicos del subtipo  $M_1$ , lo cual ha quedado demostrado por el hecho de que la interrupción quirúrgica de la vía dopaminérgica nigroestriatal produce una reducción significativa de los sitios de unión para la [ $^3H$ ]-pirenzepina en el neostriado de la rata (Pittaluga y cols., 1987). Por otra parte, se ha demostrado que la estimulación del subtipo de receptor muscarínico  $M_1$  parece favorecer la liberación de dopamina

dependiente de potenciales de acción en el neocortículo (Xu y cols., 1989). Utilizando la técnica de microdialisis, estos investigadores observaron que el compuesto AF102B, un agonista selectivo  $M_1$ , incrementa la liberación de dopamina en el neocortículo de una manera dosis-dependiente, siendo este efecto bloqueado con pirenzepina. En cambio, el AF-DX 116 por sí solo facilitó la liberación de dopamina y además mostró un efecto aditivo sobre la liberación de dopamina evocada por el AF102B. Con base en sus resultados, estos autores sugirieron que la facilitación de la liberación de dopamina en el neocortículo está mediada principalmente por el subtipo  $M_1$ , en tanto que el efecto inhibitorio está mediado por el subtipo  $M_2$ . Estos datos concuerdan con nuestros resultados en el sentido de que la pirenzepina, a nivel de la SM, bloqueó el efecto del agonista muscarínico di-muscarina sobre el recambio de dopamina en el neocortículo, en tanto que el AF-DX 116 facilitó este efecto. La presencia de receptores colinérgicos muscarínicos en la SM, se ha demostrado mediante la estimación de los sitios de unión al [ $^3$ H]-benzilato de quinuclidinilo. Estos receptores parecen estar localizados en las dendritas o los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas nigrales pues se reducen en forma significativa al aplicar 6-HODA en la SM (Cross y Waddington, 1980). Ahora bien, aunque no se han efectuado estudios inmunocitoquímicos que demuestren la presencia de sitios de unión para el antagonista selectivo  $M_2$  en la SM, el hecho de que el AF-

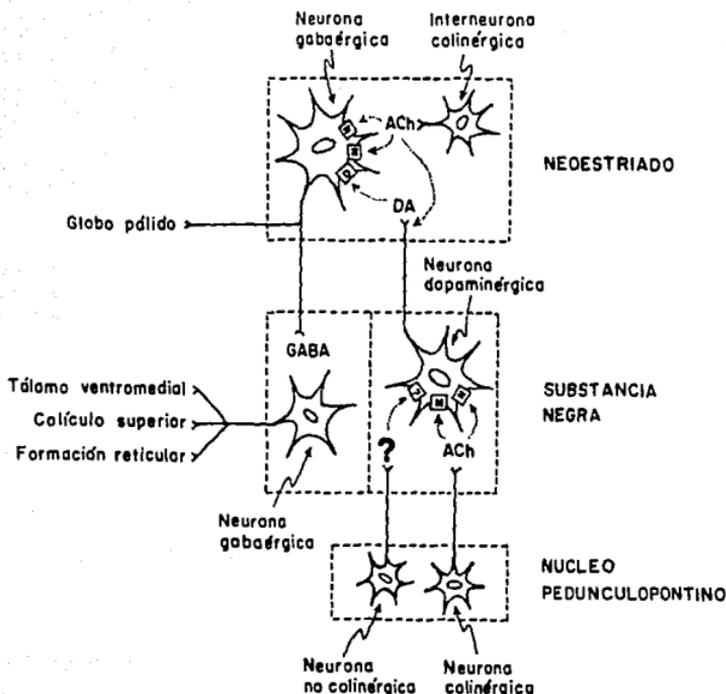
DX 116 haya facilitado el incremento en el recambio de la dopamina inducido por la di-muscarina, sugiere que también el subtipo muscarínico  $M_2$  está modulando la actividad de las neuronas dopaminérgicas. Es razonable pensar entonces que ambos subtipos de receptores muscarínicos se encuentran tanto en la terminal dopaminérgica como en el soma y que el receptor  $M_1$  parece mediar un efecto excitatorio en tanto que el receptor  $M_2$  parece mediar un efecto inhibitorio.

Ahora bien, estos resultados no descartan la posibilidad de que el efecto de la acetilcolina se deba a la activación de receptores nicotínicos que, como ya se mencionó, parecen ser muy abundantes en la *pars compacta* de la sustancia *nigra*. De hecho se ha observado que la nicotina aplicada por vía sistémica o iontoforética, incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas (Lichtensteiger y cols., 1982; Clarke y cols., 1985), así como la liberación de dopamina en el neostriado (Damsma, 1988). Sin embargo este punto requiere un mayor estudio, pues como lo demuestran nuestros resultados, la mecamilamina, un antagonista nicotínico que actúa centralmente, no parece bloquear el incremento de DOPAC inducido por la administración de ácido kaínico en el NPP (ver la figura 16).

**F) Evidencias de que exista una vía colinérgica pedunculopontino-nigral**

La administración de ácido kainico en el núcleo pedunculopontino produjo un rápido incremento en la concentración de DOPAC en el neostriado ipsilateral. Este efecto fué bloqueado significativamente por el antagonista muscarínico escopolamina, administrado por vía sistémica, pero no por el antagonista nicotínico mecamilamina (ver la figura 16 ). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la acetilcolina puede modular la actividad de la vía nigroestriatal, a través de la activación de receptores muscarínicos localizados en la membrana somatodendrítica de las neuronas dopaminérgicas. Como puede observarse, el bloqueo producido por la escopolamina solo fué significativo durante los 70 minutos posteriores a la aplicación del ácido kainico. Este hallazgo sugiere que la participación de la vía colinérgica en la activación de la vía nigroestriatal es más importante en las etapas iniciales de la activación del NPP. Dado que éste último tiene conexiones recíprocas con la mayoría de los ganglios basales (Saper y Loewy, 1982), es posible que el incremento de DOPAC observado en etapas tardías se deba a la activación de una vía polisináptica. Asimismo, tampoco puede descartarse la posibilidad de que parte del efecto se deba a la

activación de las neuronas no colinérgicas del NPP que inervan a la SN (Beninato y Spencer, 1987), que podrían liberar un neurotransmisor excitatorio (ver la figura 16). Cabe mencionar que la utilización del ácido Kainico no es el método más adecuado para producir estimulación neuronal, puesto que se sabe que después de un período ocasiona un daño celular irreversible. Sin embargo, se ha observado que con una dosis mayor que la empleada por nosotros (0.5 µg), el Kainato produce una estimulación neuronal selectiva durante una etapa aguda de 30 a 90 minutos (Nijima y Yoshida, 1987). La estimulación eléctrica en este caso no es conveniente debido a que el área del tegmento mesencefálico en la que se encuentra situado el núcleo pedunculopontino es cruzada por una gran cantidad de fibras de paso que serían activadas, lo cual no sucede con el ácido Kainico, que solamente afecta somas neuronales. Otro motivo para utilizar el ácido Kainico en este trabajo, fué comparar nuestros resultados con los estudios en los cuales se ha reportado que el ácido Kainico, administrado en el núcleo pedunculopontino, produce un incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* ipsilateral (Clarke y cols., 1987), y conducta de giro (Nijima y Yoshida, 1988). Sin embargo, posteriormente se ensayarán otras formas de estimulación utilizando agonistas de receptores glutamatérgicos NMDA que se sabe estimulan a las neuronas del SNC y producen menor daño celular.



**FIGURA 18**

**Esquema que ilustra los posibles sitios de acción de las vías colinérgicas en los ganglios basales**

1) La acetilcolina (ACh) liberada por las interneuronas colinérgicas del neocóstriado, podría modular la frecuencia de disparo de las neuronas gabaérgicas de proyección (espinosas medianas), así como la liberación de dopamina (DA) de las terminales de la vía nigro-estriatal. 2) La acetilcolina liberada por las neuronas colinérgicas del núcleo pedúnculo-pontino, podría modular la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra. [D] = receptor dopaminérgico; [N] = receptor colinérgico nicotínico; [M] = receptor colinérgico muscarínico; [?] = receptor para un neurotransmisor no identificado (?).

### G) Implicaciones fisiológicas

La caracterización voltamétrica de la vía colinérgica pedunculopontino-nigral constituye un respaldo funcional a los estudios conductuales en los cuales se ha observado que la conducta de alimentación puede ser inducida en animales saciados mediante la administración de sustancias colinérgicas en la sustancia *nigra* (Winn y Redgrave, 1981), y que este efecto se puede bloquear con bajas dosis de haloperidol, lo cual demuestra que la vía dopaminérgica nigroestriatal está involucrada en dicha conducta (Taha y Redgrave, 1980). Cabe mencionar aquí, que al estimular el núcleo pedunculopontino con ácido kaínico se observa un aumento en la frecuencia respiratoria y movimientos masticatorios. Estos últimos podrían estar relacionados con la conducta de alimentación, sin embargo hacen falta más estudios para aclarar este punto.

En conjunto, nuestros resultados concuerdan con los hallazgos morfológicos que demuestran que el núcleo pedunculopontino parece ser la mayor fuente de la inervación colinérgica que llega a la sustancia *nigra* (Beninato y Spencer, 1987; Gould y cols., 1989). Esto implica que el núcleo pedunculopontino puede estar regulando la actividad de los ganglios basales a través de la vía nigroestriatal, lo cual podría ayudar a explicar efectos directos

e indirectos del NPP sobre las funciones motoras extrapiramidales. Si consideramos el hecho de que el NPP recibe aferentes de las principales fuentes de salida de los ganglios basales, es razonable pensar que dicho núcleo podría tener una función de relevo y regular las influencias de los ganglios basales sobre el sistema motor inferior. Ahora bien, es probable que la vía pedunculopontino-nigral regule de manera indirecta a los núcleos de salida de los ganglios basales (núcleo entopeduncular y *SN reticulata*), los cuales envían proyecciones GABAérgicas hacia el mismo NPP y hacia otros núcleos muy relacionados con el control de la actividad motora, tales como el núcleo ventromedial del tálamo, el colículo superior y diversos núcleos de la formación reticular. Esta influencia sería precisamente a través de la modulación de la actividad de la vía dopaminérgica nigroestriatal.

En la enfermedad de Parkinson se ha observado una pérdida de las neuronas del NPP (Papez, 1942; citado por García-Rill, 1986), así como una reducción importante en los niveles de acetiltransferasa de colina en la *pars compacta* de la sustancia *nigra* (Lloyd y cols., 1975; Javoy-Agud y cols., 1981). Por lo tanto, es posible que al degenerar las neuronas del NPP se vea interrumpida la transmisión colinérgica espontánea que este núcleo ejerce normalmente sobre la *SNc*, ocasionando que las neuronas dopaminérgicas disminuyan su frecuencia de disparo liberando menos dopamina a nivel de la terminal, con la consiguiente alteración en

el funcionamiento global de los ganglios basales.

Esta misma explicación podría tomarse en cuenta al considerar las anomalías posturales observadas en la enfermedad de Alzheimer en la cual se ha visto también una degeneración de las neuronas del NPP (Vincent y cols., 1983). Sin embargo pensamos que para estudiar mejor la relación del núcleo pedunculopontino con los desórdenes motores extrapiramidales será necesario lesionar selectivamente a las neuronas colinérgicas del NPP, utilizando por ejemplo la colinotoxina AF64A (Hanin, 1983), y evaluar posteriormente los cambios en la liberación de dopamina en el neostriado, haciendo una correlación con los cambios en la conducta motora. En el futuro, pretendemos efectuar estos estudios utilizando la técnica de microdiálisis en animales despiertos.

## VII. CONCLUSIONES

1) La administración de fisostigmina por vía sistémica produce un incremento significativo en la concentración extracelular de DOPAC en el neostriado de la rata anestesiada. Este efecto es bloqueado con escopolamina, un antagonista muscarínico.

2) La administración de fisostigmina en la sustancia *nigra* produce un incremento significativo en la concentración extracelular de DOPAC en el neostriado ipsilateral de la rata anestesiada. Este efecto es mayor cuando la administración del fármaco se efectúa en la vecindad de la *pars compacta* y disminuye en sitios distantes a esta estructura.

3) La administración de dl-muscarina en la sustancia *nigra* produce un incremento significativo en la concentración extracelular de DOPAC en el neostriado ipsilateral de la rata anestesiada. Este efecto es bloqueado con pirenzepina, un antagonista  $M_1$ , y facilitado con AF-DX116, un antagonista  $M_2$ .

4) La administración de ácido kaínico en el núcleo pedunculopontino produce un incremento significativo en la concentración extracelular de DOPAC en el neostriado ipsilateral de la rata anestesiada. Este efecto es bloqueado en forma parcial

con escopolamina administrada por vía sistémica. En cambio, la mecamilamina, un antagonista nicotínico que actúa centralmente, no bloquea el incremento de DOPAC inducido con ácido kaínico.

Estos resultados sugieren que las terminales colinérgicas que llegan a la substancia *nigra* están acopladas funcionalmente con las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta*. Puesto que el efecto de la fisostigmina fué mimetizado por la di-muscarina y bloqueado por la escopolamina, es probable que parte del efecto de la acetilcolina endógena se deba a la activación de receptores muscarínicos. El hecho de que la pirenzepina haya bloqueado el efecto inducido por la di-muscarina, sugiere que los receptores muscarínicos que median el efecto de la acetilcolina endógena son del subtipo  $M_1$ , posiblemente localizados en los somas de las neuronas dopaminérgicas. El incremento del DOPAC producido por la estimulación del núcleo pedunculopontino pudo deberse en parte a la activación de los receptores muscarínicos de las neuronas dopaminérgicas de SMC, por la acetilcolina liberada de las terminales de la vía colinérgica procedente del NPP. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que la escopolamina bloqueó parcialmente este efecto.

## VIII. REFERENCIAS

- Adams, R.H. and Marsden, C.A., 1982, Electrochemical detection methods for monoamine measurements in vitro and in vivo, In: Handbook of psychopharmacology, Vol. 15, eds. L.L. Iversen, S.D. Iversen and S.H. Snyder (Plenum Press, New York) p. 1-74.
- Andén, K.-E., Fuxe, K., Hamberger, B. and Hökfelt, T., 1966, A quantitative study on the nigro-neostriatal dopamine neuron system in the rat, *Acta Physiol. Scand.* 67, 306.
- Anderson, M.E. and Yoshida, M., 1980, Axonal branching patterns and location of nigrothalamic and nigrocollicular neurons in the cat, *J. Neurophysiol.*, 43, 863-895.
- Akaike, A., Ohno, Y., Sasa, M. and Takaori, S., 1987, Excitatory and inhibitory effects of dopamine on neuronal activity of the caudate nucleus neurons in vitro, *Brain Res.* 418, 262.
- Armstrong, D.M., Saper, C.B., Levey, A.I., Wainer, B.H. and Terry, R.D., 1983, Distribution of cholinergic neurons in rat brain demonstrated by immunocytochemical localization of choline acetyltransferase, *J. Comp. Neurol.* 216, 53-66.
- Aronson, H.I., Becker, B.E. and McGovern, W.A., 1962, A study in experimental tremor, *Confin. Neurol.* 22, 397-429.
- Bartholini, G., 1980, Interaction of striatal dopaminergic, cholinergic and GABA-ergic neurons: relation to extrapyramidal function, *Trends. Pharmacol. Sci.* 1, 138-140.
- Beckstead, R.M., Domesick, V.B., and Nauta, W.J.H., 1979, Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat, *Brain Res.* 175, 191-217.
- Beckstead, R.M. and Frankfurter, A., 1982, The distribution and some morphological features of substantia nigra neurons that project to the thalamus, superior colliculus and pedunculopontine nucleus in the monkey, *Neuroscience*, 7, 2377-2386.
- Beninato, M. and Spencer, R.F., 1987, A cholinergic projection to the rat substantia nigra from the pedunculopontine tegmental nucleus, *Brain Res.* 412, 169-174.
- Beninato, M. and Spencer, R.F., 1988, The cholinergic innervation of the rat substantia nigra: a light and electron microscopic

- immunohistochemical study, *Exp. Brain Res.* 72, 176-184.
- Birdsall, R.J.M., Hulme, E.C. and Burgen, S.A., 1980, The character of the muscarinic receptors in different regions of the rat brain, *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 207, 112.
- Boisacq-Schepens, M. and Hanus, M., 1972, Motor cortex vestibular responses in the chloralosed cat, *Exp. Brain Res.* 14, 539-549.
- Bolam, J.P., Somogyi, P., Totterdell, S. and Smith, A.D., 1981, A second type of striatonigral neuron: A comparison between retrogradely labelled and Golgi-stained neurons at the light and electron microscopic levels, *Neuroscience*, 6, 2141-2157.
- Bonanno, G., Marchi, M. and Raiteri, M., 1985, Activation of muscarinic receptors on striatal synaptosomes increases the release of endogenous dopamine, *Neuropharmacol.* 24, 261-264.
- Brazell, M.P., Kasser, R.J., Renner, K.J., Feng, J., Moghaddam, B. and Adams, R.H., 1987, Electrocoating carbon fiber microelectrodes with Nafion improves selectivity for electroactive neurotransmitters, *J. Neurosci. Meth.* 22, 167-172.
- Brodal, A., 1981, *Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine*, Oxford Press, London, pp. 1053.
- Brooks, V.B., Rudomin, P. and Slayman, C.L., 1961, Sensory activation of neurons in the cats' cerebral cortex, *J. Neurophysiol.* 24, 288-301.
- Buda, M.J., Gonon, F.G., Cespuglio, R., Jouvet, M. and Pujol, J.F., 1981, In vivo electrochemical detection of catechols in several dopaminergic brain regions of anaesthetized rats, *Eur. J. Pharmacol.* 73, 61.
- Bunney, B.S., and Aghajanian, G.K., 1975, The effect of antipsychotic drugs on the firing of dopaminergic neurons: a reappraisal, In: *Antipsychotic drugs: pharmacodynamics and pharmacokinetics*, edited by G. Sedvall, B. Uvnäs, Y. Zotterman, New York, Pergamon Press, pp. 305-316.
- Bunney, B.S., Walters, J.R., Roth, R.H. and Aghajanian, G.K., 1973, Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185, 560-571.
- Busser, P. and Imbert, M., 1981, Sensory projections to the motor cortex in cats: a microelectrode study. In W.A. Rosenblith

- (Ed.) Sensory Communication, Wiley Press, New York, 1961, pp. 294-322.
- Carpenter, M.B., Carleton, S.C., Keller, J.T. and Conte, P., 1981, Connections of the subthalamic nucleus in the monkey, *Brain Res.* 224, 1-29.
- Cheney, D.L., Racagni, G. and Costa, E., 1976, Appendix II: Distribution of acetylcholine and choline acetyltransferase in specific nuclei and tracts of rat brain, in: *Biology of Cholinergic Function*, eds. A.M. Goldberg and I. Hanin (Raven Press, New York) p. 655.
- Chevalier, G. and Deniau, J.M., 1982, Inhibitory nigral influence on cerebellar evoked response in the rat ventromedial thalamic nucleus, *Exp. Brain Res.*, 48, 369-376.
- Clarke, P.B.S., Schwartz, R.D., Paul, S.H., Pert, C.B. and Pert, A., 1985, Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [<sup>3</sup>H]acetylcholine, [<sup>3</sup>H]nicotine, and [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -bungarotoxin, *J. Neurosci.* 5, 1307-1315.
- Clarke, P.B.S., and Pert, A., 1985, Autoradiographic evidence for nicotine receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic neurons, *Brain Res.* 346, 355-356.
- Clarke, P.B.S., Hommer, D.W., Pert, A. and Skirboll, L.R., 1987, Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunculopontine nucleus in the rat: neuroanatomical and electrophysiological evidence, *Neuroscience*, 23, 1011-1019.
- Collingridge, G.L. and Davies, J., 1981, The influence of striatal stimulation and putative neurotransmitters on identified neurones in the rat substantia nigra, *Brain Res.* 212, 345.
- Cross, A.J. and Waddington, J.L., 1980, [<sup>3</sup>H]-quinuclidinyl benzylate and [<sup>3</sup>H]-GABA receptor binding in rat substantia nigra after 6-hydroxydopamine lesions, *Neurosci. Lett.* 17, 271-275.
- Damsma, G., Westerink, B.C.H., de Vries, J.B. and Horn, A.S., 1986, The effect of systemically applied cholinergic drugs on the striatal release of dopamine and its metabolites, as determined by automated brain dialysis in conscious rats, *Neurosci. Lett.* 89, 349-354.
- DeLong, M.R. and Georgopoulos, A.P., 1979, Motor functions of the basal ganglia as revealed by studies of single cell activity

- in the behaving primate, *Adv. Neurol.*, 24, 131-140.
- De Montis, G.M., Olinas, M.C., Serra, G., Tagliamonte, A. and Scheel-Krüger, J., 1979, Evidence that a nigral gabaergic-cholinergic balance controls posture, *Eur. J. Pharmacol.* 53, 161.
- Deniau, J.M., Hamond, C., Rizk, A. and 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.
- DeVito, J.L., Anderson, M.E. and Walsh, K.E., 1980, A horseradish peroxidase study of afferents connections of the globus pallidus in *macaca mulatta*, *Exp. Brain Res.* 38, 65-73.
- DiChiara, G., Porceddu, M.L., Morelli, M., Mulas, M.L. and Gessa, G.L., 1979, Evidence for a GABAergic projection from the substantia nigra to the ventromedial thalamus and to the superior colliculus of the rat, *Brain Res.* 176, 273-284.
- DiFiglia, M., Aronin, E. and Leeman, S.E., 1981, Immunoreactive substance P in the substantia nigra of the monkey: light an electron microscopic localization, *Brain Res.* 233, 381-395.
- Dodt, H.U. and Misgeld, U., 1986, Muscarinic slow excitation and muscarinic inhibition of synaptic transmission in the rat neostriatum, *J. Physiol.* 380, 593-608.
- Downie, E.M. and Heath, R.W., 1970, *Basic Statistical Methods*, Third edition (Harper & Row publishers Inc., New York).
- Fallon, J.H., 1986, Topographic organization of ascending dopaminergic projections, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 537, 1-9.
- Fallon, J.H. and Loughlin, S.E., 1985, *Substantia nigra, En: The rat nervous system*, vol. 1, ed. G. Paxinos (Academic Press Australia), p. 353-374.
- Fass, B. and Butcher, L.L., 1981, Evidence for a crossed nigrostriatal pathway in rats, *Neurosci. Lett.* 22, 109-113.
- Fillion, M. and Harnois, C., 1978, A comparison of projections of entopeduncular neurons to the thalamus, the midbrain and the habenula in the cat, *J. Comp. Neurol.*, 181, 763-780.
- Fonnum, F., Gottesfeld, Z. and Grofova, I., 1978, Distribution of glutamate decarboxylase, choline acetyltransferase and

- aromatic amino acid decarboxylase in the basal ganglia of normal and operated rats. Evidence for striatopallidal, striatoentopeduncular, and striatonigral Gabaergic fibers, *Brain Res.* 143, 125-136.
- Freund, T.F., Powell, J.F. and Smith, A.D., 1984, Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines, *Neuroscience* 13, 1189.
- Garcia-Rill, E., 1986, The basal ganglia and the locomotor regions, *Brain Res. Rev.* 11, 47-63.
- Garcia-Rill, E. and Dubrovsky, B., 1973, Topographical organization of visual input to precruciate cortex of cat, *Brain Res.* 56, 151-163.
- Garcia-Rill, E., and Skinner, R.D., 1985, The mesencephalic locomotor region. I. Descending cholinergic projections to the medial tegmental field, *Anat. Rec.* 211, 65A.
- Garcia-Rill, E. Nieto, A., Adinolfi, A., Hull, C.D. and Butchwald, H.A., 1979, Projections to the neostriatum from the cat precruciate cortex. *Anatomy and Physiology, Brain Res.* 170, 393-407.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D. and Fitzgerald, J.A., 1983, Control of locomotion using localized injections of GABA agonists and antagonists into the mesencephalic locomotor region (MLR), *Neurosci. Abstr.* 9, 357.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D. and Fitzgerald, J.A., 1985, Chemical activation of the mesencephalic locomotor region, *Brain Res.* 330, 43-54.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D. and Gilmore, S.A., 1981, Pallidal projections at the mesencephalic locomotor region (MLR) in cat, *Am. J. Anat.* 161, 311-321.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D., Gilmore, S.A. and Owings, R., 1983, Connections of the mesencephalic locomotor region (MLR). II. Afferents and efferents, *Brain Res. Bull.* 10, 63-71.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D., Jackson, H.B. and Smith, H.H., 1983, Connections of the mesencephalic locomotor region (MLR). I. Substantia nigra afferents, *Brain Res. Bull.* 10, 57-62.
- Gerfen, C.R., Staines, W.A., Arbuthnott, G.W. and Fibiger, H.C., 1982, Crossed connections of the substantia nigra in the rat,

- Giachetti, A., Micheletti, R. and Montagna, E., 1986, Cardioselective profile of AF-DX 116, a muscarine M<sub>2</sub> receptor antagonist, *Life Sci.* 36, 1663-1672.
- Giorgiuffi, M.F., M.L. Le Floch, J. Glowinski and M.J. Besson, 1977, Involvement of cholinergic presynaptic receptors of nicotinic and muscarinic types in the control of the spontaneous release of dopamine from striatal dopaminergic terminals in the rat, *J. Pharmac. Exp. Ther.* 200, 635.
- Girardo, E., Monferini, E. and Hammer, R., 1986, Selective labelling of M<sub>1</sub>-receptors in autonomic ganglia with <sup>3</sup>H-pirenzepine, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 35, 325-326.
- Gonon, F.G., 1984, Mesure *in vivo* par voltampérométrie de l'acide ascorbique et des catechols endogènes dans le cerveau du rat, Thèse pour obtenir le grade de docteur d'Etat ès Sciences, Université Claude-Bernard, Lyon, France.
- Gonon, F.G., 1987, In vivo electrochemical monitoring of dopamine release, In: *Voltammetry in the Neurosciences*, J.B. Justice (ed.), The Humana Press, Inc., pp. 163-163.
- Gonon, F.G. and Buda, M.J., 1985, Regulation of dopamine release by impulse flow and by autoreceptors as studied by *in vivo* voltammetry in the rat striatum, *Neuroscience* 14, 765-774.
- Gonon, F.G., Buda, M.J., Cespuglio, R., Jouvet M. and Pujol, J.F., 1980, In vivo electrochemical detection of catechols in the neostriatum of anaesthetized rats: dopamine or DOPAC?, *Nature* 286, 902-904.
- Gonon, F.G., Buda, M.J., Cespuglio, R., Jouvet, M., and Pujol, J.F., 1981, Voltammetry in the striatum of chronic freely moving rats: detection of catechols and ascorbic acid, *Brain Res.* 223, 69-80.
- Gonon, F.G., Fombarlet, C.M., Buda, M.J. and Pujol, J.F., 1981b, Electrochemical treatment of pyrolytic carbon fiber electrodes, *Anal. Chem.* 53, 1386-1389.
- Gould, E., Wolf, E.J. and Butcher, L.L., 1989, Cholinergic projections to the substantia nigra from the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei, *Neuroscience*, 28, 611-623.
- Grace, A.A., and Bunney, B.S., 1985, Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell

- activity, *Brain Res.* 333, 271-284.
- Grace, A.A., Hommer, D.W. and Bunney, B.S., 1980, Peripheral and striatal influences on nigral dopamine cells: mediation by reticulata neurons, *Brain Res. Bull.* 5, 105-109.
- Graybiel, A.M., 1977, Direct and indirect preoculomotor pathways of the brainstem: an autoradiographic study of the pontine reticular formation in cat, *J. Comp. Neurol.* 175, 37-78.
- Greenfield, S.A., Jack, J.J., Last, A.T.J. and French, M., 1986, An electrophysiological action of acetylcholinesterase independent of its catalytic site, *Exp. Brain Res.* 70, 441-444.
- Greenfield, S.A., Stein, J.F., Hodgson, A.J. and Chubb, I.W., 1981, Depression of nigral pars compacta cell discharge by exogenous acetylcholinesterase, *Neuroscience* 6, 2287-2295.
- Grenhoff, J., Aston-Jones, G. and Svensson, T.H., 1986, Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons, *Acta. Physiol. Scand.* 128, 351-358.
- Hammer, R., Berris, C.P., Birdsall, H.J.M., Burgen, A.S.V. and Hulme, E.C., 1980, Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors, *Nature* 283, 90-92.
- Hammer, R., Giraldo, E., Schiavi, G.B., Monferini, E. and Ladinsky, H., 1986, Binding profile of a novel cardioselective muscarinic receptor antagonist, AF-DX 116, to membranes of peripheral tissues and brain in the rat, *Life Sci.* 38, 1653-1662.
- Hanin, I., 1983, AF64A, a novel cholinotoxin: potential tool in cholinergic receptor research?, In: *Trends. Pharmacol. Sci., Proceedings of the International Symposium on Subtypes of Muscarinic Receptors*, edited by: B.I. Hirschowitz, R. Hammer, A. Giachetti, J.J. Keirns and R.R. Levine, Elsevier, pp. 94-97.
- Harnois, C. and Fillion, M., 1980, Pallidal neurons branching to the thalamus and the midbrain in the monkey, *Brain Res.* 186, 222-225.
- Harris, M.C., Webb, C. and Greenfield, S.A., 1989, The effects of gamma-hydroxybutyrate on the membrane properties of guinea-pig pars compacta neurons in the substantia nigra *in vitro*, *Neuroscience* 31, 363-370.

- Hattori, T., McGeer, P.L., Fibiger, H.C. and McGeer E.G., 1973, On the source of GABA-containing terminals in the substantia nigra. Electron microscopic autoradiographic and biochemical studies, *Brain Res.* 54, 103-114.
- Heedren, J.C., 1971, Separate demonstration of dopaminergic and non-dopaminergic projections of substantia nigra in the rat, *Anat. Rec.* 169, 338.
- Henderson, Z. and Greenfield, S.A., 1987, Does the substantia nigra have a cholinergic innervation?, *Neurosci. Lett.* 73, 109-113.
- Hopkins, D.A. and Holstege, G., 1978, Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat, *Expl. Brain Res.* 32, 529-547.
- Hopkins, D.A. and Hiessen, L.W., 1976, Substantia nigra projections to the reticular formation, superior colliculus and central gray in the rat, *Neurosci. Lett.* 2, 253-259.
- Hornykiewicz, O., 1972, Neurochemistry of Parkinsonism, In: *Handbook of Neurochemistry*, Vol. 7, Pathological Chemistry of the Nervous System, Abel Lajtha (ed.), Plenum Press, New York, pp. 465-501.
- Houser, C.R., Crawford, G., Anderson, L., Barber, R., Salvaterra, P.M. and Vaughn, J.E., 1982, Immunocytochemical localization of cholinergic neurons with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase, *Neurosci. Abstr.*, 8, 662.
- Imperato, A. and Di Chiara, G., 1984, Trans-striatal dialysis coupled to reverse phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection: a new method for the study of the *in vivo* release of endogenous dopamine and metabolites, *J. Neurosci.* 4, 966-977.
- Jackson, A. and Crossman, A.R., 1981, Basal ganglia and other afferent projections to the peribrachial region in the rat: a study using retrograde and anterograde transport of horseradish peroxidase, *Neuroscience*, 6, 1537-1549.
- Jackson, A. and Crossman, A.R., 1983, Nucleus tegmenti pedunculopontinus: efferent connections with special reference to the basal ganglia, studied in the rat by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase, *Neuroscience*, 10, 725-765.
- Jacobowitz, D.M. and Goldberg, A.M., 1977, Determination of

- acetylcholine in discrete regions of the rat brain, *Brain Res.* 122, 575-577.
- James, T.A. and Massey, S., 1978, Evidence for a possible dopaminergic link in the action of acetylcholine in the rat substantia nigra, *Neuropharmacol.* 17, 687-690.
- Javoy-Agid, F., Agid, Y., Bouvet D. and Glowinski, J., 1974, Changes in neostriatal DA metabolism after carbachol or atropine microinjections into the substantia nigra, *Brain Res.* 66, 253.
- Javoy-Agid, F., Ploska, A. and Agid, Y., 1981, Microtophography of tyrosine hydroxylase, glutamic acid decarboxylase, and choline acetyltransferase in the substantia nigra and ventral tegmental area of control and parkinsonian brains, *J. Neurochem.* 37, 1218-1227.
- Jessel, T.M., Emson, P.C. Paxinos, G. and Cuello A.C., 1978, Topographic projections of substance P and GABA pathways in the striato- and pallido-nigral system: a biochemical and immunohistochemical study, *Brain Res.* 152, 487-498.
- Kilpatrick, I.C., Starr, M.S., Fletcher, A., James, T.A. and MacLeod, N.K., 1980, Evidence for a GABAergic nigrothalamic pathway in the rat. I. Behavioral and Biochemical studies, *Exp. Brain Res.* 40, 45-54.
- Kilpatrick, I.C., Collingridge, G.L., and Sarr, M.S., 1982, Evidence for the participation of nigrotectal gamma-aminobutyrate-containing neurons in striatal and nigral-derived circling in the rat, *Neuroscience* 7, 207-222.
- Kim, R., Nakano, K., Jayaraman, A. and Carpenter, M.B., 1976, Projections of the globus pallidus and adjacent structures: an autoradiographic study in the monkey, *J. Comp. Neurol.* 169, 263-290.
- Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, F. and McGeer, e.g., 1980, Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry, *Science* 208, 1057.
- Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H. and McGeer, E.G., 1981, The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunocytochemistry in the cat, *J. Comp. Neurol.* 200, 151-201.
- Kobayashi, R.M., Brownstein, M., Saavedra, J.M. and PalKovitz, M.,

- 1975, Choline acetyltransferase content in discrete regions of the rat brainstem, *J. Neurochem.* 24, 637-640.
- Kocsis, J.D. and Kitai, S.T., 1977, Dual excitatory inputs to caudate spiny neurons from substantia nigra stimulation, *Brain Res.* 138, 271.
- Kocsis, J.D., Sugimori M. and Kitai, S.T., 1977, Convergence of excitatory synaptic inputs to caudate spiny neurons, *Brain Res.* 124, 403.
- Kuypers, H.G.J.M. and Lawrence, D.G., 1967, Cortical projections to the red nucleus and the brainstem in the rhesus monkey, *Brain Res.* 4, 151-188.
- Larsen, K.D. and McBride, R.L., 1979, The organization of feline entopeduncular nucleus projections: anatomical studies, *J. Comp. Neurol.* 184, 293-308.
- Lehmann, J. and Langer, S.Z., 1982, Muscarinic receptors on dopamine terminals in the cat caudate nucleus: neuromodulation of [<sup>3</sup>H]dopamine release in vitro by endogenous acetylcholine, *Brain Res.* 248, 61-69.
- Lehmann, J. and Langer, S.Z., 1983, The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopaminergic terminals?, *Neuroscience* 10, 1105-1120.
- Lichtensteiger, W., Felix, D., Lienhart, R. and Hefti, F., 1976, A quantitative correlation between single unit activity and fluorescence intensity of dopamine neurones in zona compacta of the substantia nigra as demonstrated under the influence of nicotine and physostigmine, *Brain Res.* 117, 85-103.
- Lichtensteiger, W., Hefti, F., Felix, D., Huwyler, T., Melamed, E. and Schlumpf, M., 1982, Stimulation of nigrostriatal dopamine neurones by nicotine, *Neuropharmacol.* 21, 963-968.
- Llinás, R. and Greenfield, S.A., 1987, On-line visualization of dendritic release of acetylcholinesterase from mammalian substantia nigra neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 3047-3050.
- Lloyd, K.G., Möhler, H., Heitz, Ph., and Bartholini, G., 1975, Distribution of choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase within the substantia nigra and in other brain regions from control and parkinsonian patients, *J. Neurochem.* 25, 789-795.

- Loughlin, S.E. and Fallon, J.H., 1982, Mesostriatal projections from ventral tegmentum and dorsal raphe: Cells project ipsilaterally or contralaterally but not bilaterally, *Neurosci. Lett.* 32, 11-16.
- MacLeod, H.K., James, T.A., Kilpatrick, I.C., and Starr, M.S., 1980, Evidence for a GABAergic nigrothalamic pathway in the rat. II. Electrophysiological studies, *Exp. Brain Res.* 40, 55-61.
- Marchi, M., Paudice, P., Bonanno, G. and Raiteri, M., 1985, Presynaptic muscarinic receptor activation enhances striatal dopamine release evoked by depolarization but not that induced by non-depolarizing stimuli, *Neurochem. Int.* 7, 137-141.
- Marsden, C.A., Joseph, M.H., Kruk, Z.L., Maidment, M.T., O'Neill, R.D., Schenk, J.O. and Stamford, J.A., 1980, In vivo voltammetry - Present electrodes and methods, *Neuroscience*, 25, 389-400.
- Martin, J.P., 1967, Locomotion and the basal ganglia. In *The Basal Ganglia and Posture*, Pitman, London, pp. 20-35.
- Martinez-Murillo, R., Villalba, R.M. and Rodrigo, J., 1989, Electron microscopic localization of cholinergic terminals in the rat substantia nigra: an immunocytochemical study, *Neurosci. Lett.* 96, 121-126.
- Massey, S.C. and James, T.A., 1976, The uptake of  $^3\text{H}$ -choline and release of  $^3\text{H}$ -acetylcholine in the rat substantia nigra, *Life Sci.* 23, 345.
- Mesulam, M.H., Mufson, E.J., Wainer, B.H. and Levey, A.I., 1983, General cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature, *Neuroscience* 10, 1185-1201.
- Moon Edley, S. and Graybiel, A.M., 1980, Connections of the nucleus tegmenti pedunculopontinus, pars compacta (TPc) in cat, *Anat. Rec.* 196, 129A.
- Nagai, T., McGeer, P.L., Peng, H.H., McGeer, E.G. and Dolman, C.E., 1985, Choline acetyltransferase immunohistochemistry in brains of Alzheimer's disease patients and controls, *Neurosci. Lett.* 36, 195-199.
- Nagy, J.L., Vincent, S.R., Lehmann, J., Fibiger, H.C. and McGeer, E.G., 1976, The use of kainic acid in the localization of enzymes in the substantia nigra, *Brain Res.* 149, 431-441.

- Nauta, W.J.H., Smith, G.P., Faull, R.L.M. and Domesick, V.B., 1978, Efferents connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat, *Neuroscience*, 3, 385-401.
- Nieoullon, A. and Dusticier, N., 1980, Choline acetyltransferase activity in discrete regions of the cat brain, *Brain Res.* 196, 139-149.
- Nijima, K. and Yoshida, M., 1988, Activation of mesencephalic dopamine neurons by chemical stimulation of the nucleus tegmenti pedunculo-pontinus pars compacta, *Brain Res.* 461, 163-171.
- Nitsch, C., and Riesenberger, R., 1988, Immunocytochemical demonstration of GABAergic synaptic connections in rat substantia nigra after different lesions of the striatonigral projection, *Brain Res.* 461, 127-142.
- Nomura, S., Mizuno, N. and Sugimoto, T., 1980, Direct projections from the pedunculopontine tegmental nucleus to the subthalamic nucleus in the cat, *Brain Res.* 196, 223-227.
- Pittaluga, A., Versace, P., Marchi, M. and Raiteri, M., 1987, [<sup>3</sup>H]-pirenzepine binding in rat corpus striatum decreases after hemitransection of the nigro-striatal pathway, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1, 317-325.
- Ponchon, J.L., Cespuglio, R., Gonon, F.G., Jouvret, M. and Pujol, J.-F., 1979, Normal pulse polarography with carbon fiber electrodes for in vitro and in vivo determination of catecholamines, *Annal. Chem.* 51, 1483-1486.
- Raiteri, M., Marchi, M. and Maura, G., 1982, Presynaptic muscarinic receptors increase striatal dopamine release evoked by 'quasi-physiological' depolarization, *Eur. J. Pharmacol.* 83, 127.
- Robertson, G.S., and Robertson, H.A., 1986, Synergistic effect of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine agonists on turning behavior in rats, *Brain Res.* 384, 387-390.
- Rouillard, C., and Bédard, P.J., 1988, Specific D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine agonists have synergistic effects in the 6-hydroxydopamine circling model in the rat, *Neuropharmacology* 27, 1257-1264.
- Rye, D.B., Lee, H., Ronnett, B. and Wainer, B.H., 1984, Descending cholinergic projections from the mesopontine tegmentum, *Neurosci. Abstr.*, 10, 900.

- Saper, C.B. and Loewy, A.D., 1982, Projections of the pedunculo-pontine tegmental nucleus in the rat: evidence for additional extrapyramidal circuitry, *Brain Res.* 252, 367-372.
- Satoh, K., Armstrong, D.M. and Fibiger, H.C., 1983, A comparison of the distribution of central cholinergic neurons as demonstrated by acetylcholinesterase pharmacohistochemistry and choline acetyltransferase immunohistochemistry, *Brain Res. Bull.* 11, 693-720.
- Scarnati, E., Campana, E. and Pacitti, C., 1984, Pedunculo-pontine-evoked excitation of the substantia nigra neurons in the rat, *Brain Res.* 304, 351-361.
- Scheel-Krüger, J., 1985, New aspects on the functional role of acetylcholine in the basal ganglia system, In: *Central cholinergic mechanisms and adaptive dysfunctions*, chapter 4, M.M. Singh, D.M. Warburton and H. Lal, eds. (Plenum Press, New York) p. 105.
- Scheel-Krüger, J., 1986, Dopamine-GABA interactions: evidence that GABA transmits, modulates and mediates dopaminergic functions in the basal ganglia and limbic system, *Acta Neurol. Scand.* 73 (Suppl. 107), 1.
- Semple, S.A., Smith, C.M. and Swash, M., 1982, The Alzheimer disease syndrome. In J. Corkin, K.L. Davis, J.H. Grondon, E. Ospin and A.S. Wurtman (Eds.), *Alzheimer's disease: A report of progress*, Raven Press, New York, pp. 93-107.
- Sjögren, T., Sjögren, H. and Lindgren, H., 1966, Morbus Alzheimer and Morbus Pick: a genetic clinical and pathoanatomical study, *Acta Psychiatr. Neurol. Scand.* 62, 69-114.
- Skinner, R.D., Garcia-Rill, E., Conrad, C. and Mosley, D., 1985, The mesencephalic locomotor region. II. Ascending and descending projections in rats, *Anat. Rec.* 211, 160A.
- Somogyi, P. and Smith, D., 1979, Projection of neostriatal spiny neurons to the substantia nigra. Application of a combined Golgi-staining and horseradish peroxidase transport procedure at both light and electron microscopic levels, *Brain Res.* 176, 3-15.
- Starr, M.S., 1988, D<sub>1</sub>/ D<sub>2</sub> behavioral interactions in the rat involving striatal dopamine D<sub>1</sub> receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 151, 479-482.

- Stamford, J.A., 1985, In vivo voltammetry: promise and perspective, *Brain Res. Rev.* 10, 119-135.
- Stamford, J.A., 1986, In vivo voltammetry: some methodological considerations, *J. Neurosci. Meth.* 17, 1-29.
- Sugimoto, T. and Hattori, T., 1984, Organization and eferent projections of nucleus tegmenti pedunculopontinus pars compacta with special reference to its cholinergic aspects, *Neuroscience*, 11, 931-946.
- Tago, H., McGeer, P.L., McGeer, E.G., Akiyama, H. and Hersh, L.B., 1989, Distribution of choline acetyltransferase immunopositive structures in the rat brainstem, *Brain Res.* 495, 271-297.
- Taha, E.B. and Redgrave, P., 1980, Neuroleptic supression of feeding and oral stereotypy following microinjections of carbachol into substantia nigra, *Neurosci. Lett.* 20, 357-361.
- Tokuno, H., Morizumi, T., Kudo, H. and Nakamura, Y., 1986, A morphological evidence for monosynaptic projections from the nucleus tegmenti pedunculopontinus pars compacta (TPC) to nigrostriatal projections neurons, *Neurosci. Lett.* 85, 1-4.
- Ungerstedt, U., 1984, Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis, In: *Measurement of Neurotransmitter Release in vivo*, ed. C.A. Marsden (John Wiley & Sons, Ltd.) P. 81-105.
- Vincent, S.R., Satoh, K., Armstrong, D.H. and Fibiger, H.C., 1983, Substance P in the ascending cholinergic reticular system, *Nature*, (London), 306, 688-691.
- Westerink, B.H.C., 1985, Sequence and significance of dopamine metabolism in the rat brain, *Neurochem. Int.* 7, 221-227
- Weston, J. and Greenfield, S.A., 1986, Release of acetylcholinesterase in the rat nigrostriatal pathway: relation to receptor activation and firing rate, *Neuroscience* 17, 1079-1086.
- Winn, P. and Redgrave, P., 1981, Dose-dependent feeding in the rat following substantia nigra acetylcholinesterase blockade, *Eur. J. Pharmacol.* 76, 421-425.
- Winn, P., Farrell, A., Maconick, A. and Robbins, T.W., 1983, Behavioral and pharmacological specificity of the feeding elicited by cholinergic stimulation of the substantia nigra in the rat, *Behav. Neurosci.* 97, 794-809.

- Whishaw, I.G., Cioe, J.D.D., Previsich, M. and Kolb, B., 1977, The variability of the interaural line vs the stability of bregma in rat stereotaxic surgery, *Physiol. Behav.* 19, 719-722.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Clark, A.W., Coyle, J.T. and DeLong, M.R., 1981, Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis, *Annu. Neurol.* 10, 122-126.
- Xu, H., Mizobe, F., Yamamoto, T. and Kato, T., 1989, Differential effects of  $M_1$ - and  $M_2$ -muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism in freely moving rats, *Brain Res.* 495, 232-242.