



83
24
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Modulación de la Liberación de GABA por
Dopamina Endógena en la Pars Reticulata de la
Sustancia Nigra de la Rata

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

AGUSTIN GUDIÑO MARTINEZ

TEESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pg.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
1. RECEPTORES PRESINAPTICOS.....	2
1.1 Aspectos generales.....	2
1.2 Definición.....	3
1.3 Localización.....	5
1.4 Función.....	5
2. RECEPTORES DOPAMINERGICOS.....	6
2.1 Propiedades bioquímicas.....	6
2.2 Propiedades farmacológicas.....	6
2.3 Agonistas selectivos de receptores D1.....	7
2.4 Antagonista selectivo de receptores D1.....	7
2.5 Agonistas selectivos de receptores D2.....	8
2.6 Antagonistas selectivos de receptores D2.....	8
2.7 Agonistas y antagonistas no selectivos.....	8
2.8 Fisiología de los receptores dopaminérgicos.....	9
3. SISTEMAS DOPAMINERGICOS.....	12
4. SUSTANCIA NIGRA.....	14
4.1 Anatomía de la sustancia nigra.....	14
4.2 Citología de la sustancia nigra.....	14
4.3 Relaciones de la sustancia nigra.....	15
4.3.1) Fibras aferentes de la sustancia nigra.....	15
4.3.2) Fibras eferentes de la sustancia nigra.....	17
5. LIBERACION DENDRITICA DE DOPAMINA EN LA SN.....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
HIPOTESIS DE TRABAJO.....	23
OBJETIVOS DE LA TESIS.....	24
MATERIAL.....	25
a) Animal experimental.....	25
b) Soluciones.....	25
c) Drogas.....	27
d) Dispositivo experimental.....	28

MÉTODOS.....	31
1. Lesión de la vía dopaminérgica nigro-estriatal en SN....	31
2. Evaluación de la lesión.....	32
3. Disección de la pars reticulata de la SN.....	33
4. Procedimiento experimental.....	33
5. Análisis de resultados.....	35
6. Análisis estadístico.....	36
RESULTADOS.....	37
1. Liberación de GABA radiactivo inducida por alto potasio en la pars reticulata de sustancia nigra de ratas normales y de ratas denervadas.....	37
2. Efecto de la dopamina exógena sobre la liberación de GABA inducida por alto potasio en la pars reticulata de ratas normales y denervadas.....	39
3. Efecto de los antagonistas de receptores dopaminérgicos D1 sobre la liberación de GABA inducida por potasio en ratas normales y denervadas....	41
4. Efecto de los antagonistas de receptores dopaminérgicos D2 sobre la liberación de GABA inducida por potasio de pars reticulata de ratas normales y denervadas.....	44
5. Liberación basal de GABA radiactivo en pars reticulata de ratas normales y denervadas.....	44
6. Efecto de la dopamina exógena sobre la liberación basal de GABA en la pars reticulata de ratas normales y ratas denervadas.....	46
7. Efecto de la anfetamina sobre la liberación de GABA radiactivo de rebanadas de pars reticulata de sustancia nigra de ratas normales y de ratas denervadas.....	50
DISCUSION.....	51
1. Justificación de la preparación.....	51
2. Liberación basal vs liberación inducida por alto potasio.....	56
3. Dopamina endógena vs dopamina exógena.....	58
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFIA.....	65

RESUMEN.

Se estudiaron los efectos de agonistas y antagonistas dopaminérgicos sobre la liberación de GABA inducida por K^+ (15mM) y el efecto de la dopamina endógena (movilizada por la anfetamina) sobre la liberación basal o espontánea de GABA en la pars reticulata de la sustancia nigra de ratas normales y de ratas lesionadas unilateralmente de la vía dopaminérgica nigro-estriatal con 6-hidroxidopamina. La dopamina (1 μ M) no afectó la liberación en pars reticulata de ratas normales y en ratas denervadas facilitó la liberación en un 75% aproximadamente. Incremento no modificado por la presencia del antagonista de los receptores D2 sulpiride, efecto revertido totalmente por SCH-23390 antagonista selectivo de los receptores D1. SCH-23390 inhibió un 50% la liberación en pars reticulata de ratas normales y de ratas denervadas no la afectó. Sulpiride facilitó la liberación en un 51% aproximadamente en pars reticulata de ratas normales y en ratas denervadas no tuvo ningún efecto. La dopamina (100 μ M) incrementó en forma moderada la liberación espontánea o basal GABA en ratas normales y en ratas denervadas provocó una liberación espontánea de un 40%, efecto revertido totalmente por SCH-23390. La liberación espontánea fue facilitada un 30% por la anfetamina en ratas normales, efecto que fue revertido por la presencia de SCH-23390, y en ratas denervadas no causó efecto alguno. Los resultados sugieren que la liberación de GABA de las terminales GABAérgicas es modulada por la dopamina endógena a través de los receptores presinápticos D1 presentes en la pars reticulata de la sustancia nigra de la rata.

INTRODUCCION.

El presente trabajo representa una aproximación al estudio de un tipo de receptor presináptico dopaminérgico involucrado en el papel de la dopamina liberada de las dendritas de las neuronas de la sustancia nigra de la rata. Es por esto que antes de plantear el problema que pretendemos resolver asentaremos conceptos necesarios sobre receptores y organización anatómico-funcional de la sustancia nigra.

1. RECEPTORES PRESINAPTICOS:

1.1 ASPECTOS GENERALES. En el sistema nervioso hay dos mecanismos mediante los cuales las neuronas se comunican. Uno es de naturaleza química y el otro es de naturaleza eléctrica, siendo el primero el más común para la fisiología neuronal (Ottoson, 1983). La comunicación de naturaleza química se da por medio de sustancias conocidas como neurotransmisores, los cuales se unen a receptores (son complejos proteínicos) situados en la membrana de la neurona blanco. El resultado de esta unión puede ser una excitación o bien una inhibición de la actividad neuronal. Los receptores se localizan en toda la célula neuronal (soma, dendritas y en las terminales axónicas) (Starke, 1981), y se pueden clasificar en dos grandes grupos. El primero lo forman los receptores somato-dendríticos que se localizan en el soma y en las dendritas, y al ser activados, modifican la síntesis de proteínas y/o la generación de potenciales de acción (Starke, 1981). El segundo grupo lo integran los receptores presinápticos que se

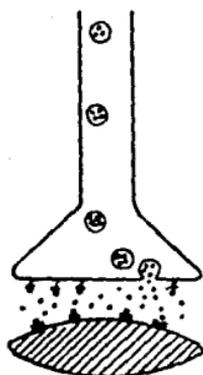
localizan en las terminales axónicas y cuando son activados, pueden modular la liberación del neurotransmisor y/o su síntesis (Starke, 1981).

La cantidad de neurotransmisor liberado puede ser modulada por depolarización local de las terminales nerviosas (Kats y Milide, 1969) así como otros factores que influyen sobre el potencial de membrana de estas terminales tales como: hormonas, nucleótidos de adenosina, anestésicos, etc. (Ottoson, 1984; Starke 1981).

En su origen el concepto de modulación de la liberación y síntesis de neurotransmisores mediado por receptores presinápticos (que ha recibido amplia atención desde la década de los setentas) (Starke, 1981), surge como una hipótesis para explicar resultados farmacológicos obtenidos del sistema nervioso periférico (Chesselet, 1984) y el primer candidato para determinar el efecto de modulación fué el neurotransmisor noradrenalina. Así, la noradrenalina reduce su propia liberación al activar receptores noradrenérgicos sobre terminales nerviosas noradrenérgicas (Langer, 1981; Starke, 1977; Westfall, 1977).

1.2 DEFINICION. Al tipo de receptores modulados por el neurotransmisor liberado por la propia neurona se les ha denominado "autorreceptores presinápticos". El término autorreceptor indica que el receptor es sensible al neurotransmisor liberado por la propia neurona y el término presináptico nos señala que los receptores se localizan en las terminales nerviosas de la misma neurona. La liberación de un neurotransmisor puede ser modulada por otros neurotransmisores que activan receptores presinápticos, a los cuales se les llama "heterorreceptores" (fig. 1). La activación de

autorreceptores



heterorreceptores

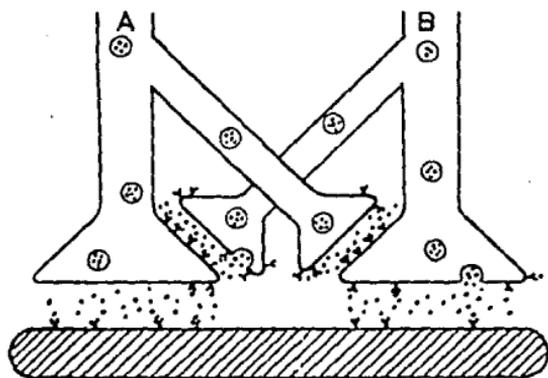


Figura 1. Representación esquemática de los dos tipos de receptores presinápticos (autorreceptores y heterorreceptores) presentes en las terminales nerviosas del sistema nervioso central.

autorreceptores conduce a una inhibición de la liberación del propio neurotransmisor neuronal; por otra parte los heterorreceptores pueden aumentar o inhibir la liberación del neurotransmisor (Langer, 1981; Starke, 1981).

1.3 LOCALIZACION. Mostrar la localización de receptores presinápticos en el sistema nervioso central es particularmente difícil, ya que en tejidos con redes neuronales se debe observar que las drogas modifiquen la liberación de las terminales nerviosas eliminando la interacción con receptores soma-dendríticos, así mismo se debe evitar que las drogas usadas activen interneuronas que hacen contacto con los axones terminales. Mediante algunas técnicas de estudio se ha podido proporcionar evidencias directas de la existencia de receptores presinápticos y su amplia distribución en el sistema nervioso, como en los experimentos de liberación de neurotransmisor radiactivo que incluyen un mecanismo de inactivación para células vecinas; experimentos con sinaptosomas; experimentos con neuronas en cultivo; experimentos con radioligandos de enlace específico, etc. (Starke, 1981).

1.4 FUNCION. Los receptores presinápticos sirven al menos a tres propósitos fisiológicos:

- a) Modulación de la actividad en la terminal axónica por la acción de agentes transportados por el torrente sanguíneo, pero originados en una parte remota del sitio de acción.
- b) Modulación por sustancias secretadas por células vecinas, en particular por neuronas vecinas.

c) Modulación por el mismo transmisor u otros agentes presentes en la sinápsis, sobre la liberación del transmisor (Starke, 1981).

2. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS.

Actualmente es muy aceptada la hipótesis de que hay solo dos categorías de receptores dopaminérgicos, como los describieron Kebabian y Calne, en 1979. Se hallan presentes en el sistema nervioso central y en ciertos tejidos endócrinos. Estos dos tipos de receptores dopaminérgicos, se les denomina: receptor D1 y receptor D2 (Kebabian y Calne, 1979), los cuales se caracterizan por sus propiedades bioquímicas y farmacológicas específicas (Stoof y Kebabian, 1984).

2.1 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS. El concepto de dos categorías o tipos de receptores dopaminérgicos surge de investigaciones bioquímicas que mostraron la habilidad de la dopamina para estimular la actividad de la adenilato ciclasa en tejidos nerviosos (Browm y Makman, 1972; Kebabian y Greengard, 1971; Kebabian et al., 1972). Ahora se sabe que la activación del receptor D1 es el que estimula a la adenilato ciclasa y el receptor D2 inhibe la estimulación de esta enzima o inhibe el metabolismo de Fosfoinositósidos (Kebabian y Calne, 1979). Bajo este modelo bioquímico del receptor dopaminérgico, muchos agonistas y antagonistas dopaminérgicos despliegan los efectos apropiados (Clement-Cormier et al., 1974; Iversen, 1975).

2.2 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS. La aceptación general de la existencia de dos tipos de receptores dopaminérgicos radica también en la disponibilidad de agonistas y antagonistas

selectivos con alta afinidad, capaces de discriminar entre estas dos categorías de receptores. Los compuestos que se mencionan más adelante se les ha llamado compuestos de la "primera generación" (ver rev. Stoff y Keibian, 1984), ya que son compuestos con relativa selectividad, pero suficiente para mostrar la existencia de los dos receptores dopaminérgicos. Es posible que en futuras investigaciones se usen compuestos (agonistas y antagonistas) altamente selectivos y con gran afinidad, los cuales pueden ser útiles como agentes terapéuticos en enfermedades en las que hay alteración de los sistemas dopaminérgicos. Por ejemplo en pacientes del mal de Parkinson se presenta una degeneración de vía nigroestriatal dopaminérgica acompañada de una alteración en el contenido de dopamina en el neostriado y cierta patología de la pars compacta de la sustancia nigra (Hornykiewicz, 1986; Zigmond, et al., 1990).

2.3 AGONISTAS SELECTIVOS DE RECEPTORES D₁. Actualmente el agonista más selectivo es la droga SKF 38393, que mimetiza la habilidad de la dopamina para estimular a la enzima adenilato ciclasa (Setler, et al., 1978; Watling y Dowling, 1981). La droga dihidroxi nomifensina es otro agonista selectivo D₁. Este compuesto estimula la adenilato ciclasa (Poat et al., 1978) y causa vasodilatación de los vasos sanguíneos en perro (Kohli y Goldberg, 1980). El enantiómero activo de dihidroxi nomifensina es el enantiómero-S.

2.4 ANTAGONISTA SELECTIVO DE RECEPTORES D₁. El antagonista selectivo de receptores D₁, SCH 23390 es un análogo estructural del SKF 38393 (Iorio et al, 1983; Hyttel, 1983; Kelly y Nahorsky, 1987).

2.5 AGONISTAS SELECTIVOS DE RECEPTORES D₂. En los pasados 10 años se ha mostrado que varias familias químicas estimulan receptores D₂. Las familias formadas por los sustituyentes di-N-fenetilaminas, RU-24920 y RU-24213, los sustituyentes di-N-5-dihidroxi-2-aminotetralinas NO-434 y NO-437, y la ergolina parcial LY-141865 que estimulan los receptores D₂ y no los receptores D₁ (Euvrard et al., 1980; Horn et al., 1984).

2.6 ANTAGONISTAS SELECTIVOS DE RECEPTORES D₂. Los antagonistas domperidone, (-)-Sulpiride y YM09151-2, cada uno bloquean al receptor D₂ y no bloquean al receptor D₁ (Grewe et al., 1982; Compton y Johnson, 1985; Kelly y Nahorsky, 1987).

2.7 AGONISTAS Y ANTAGONISTAS NO SELECTIVOS. Existen aún en uso clínico y de investigación, drogas que no tienen acción selectiva sobre un tipo de receptor; la dopamina misma es un agonista de ambos receptores, desconociéndose aún las condiciones en las que activaría a un tipo específico de receptor. La apomorfina derivado de la morfina es un agonista de ambos receptores que mimetiza la acción de la dopamina, sin embargo parece ser más afin de los receptores D-2. El haloperidol potente antipsicótico prototipo de las butirofenonas es un antagonista de la dopamina y la apomorfina, sin aparente mayor afinidad por un tipo de receptor. En una categoría especial se puede situar a la anfetamina estimulante psicomotor y fármaco facilitador de monoaminas en las terminales presinápticas, y sus derivados ya que no son drogas que activen directamente a receptores dopaminérgicos, pero prvoquen la movilización de dopamina de los compartimentos intraneuronales al medio extracelular y esta es la que activa los receptores.

2.8 FISIOLÓGIA DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS. Muchos esfuerzos se han encaminado a dilucidar y determinar el papel funcional de los receptores dopaminérgicos D1 y D2. Estudios iniciales con agonistas y antagonistas dopaminérgicos relativamente selectivos para el receptor D2 sugieren que muchos de los efectos neurofisiológicos y conductuales son producto de la estimulación de receptores dopaminérgicos del tipo D2 (Seeman, 1980; Creese et al., 1983); en los sitios donde se localizan parecen inhibir la liberación de neurotransmisores por un lado y por otro estimulan la actividad de neuronas no dopaminérgicas. No se conoce bien el papel funcional de los receptores D1 en la mediación o modulación de cualquiera de estos efectos.

Los receptores D1 en la glándula paratiroidea de bovino regulan la tasa de liberación de la hormona paratiroidea, que al ser estimulados por dopamina, causan un aumento en la actividad de la adenilato ciclasa, incremento en la producción del AMP cíclico así como la activación de una proteína kinasa dependiente del AMP cíclico (Brown et al., 1977; Attie et al., 1980; Blum et al., 1980).

Los receptores dopaminérgicos y en particular el receptor D1 se ha encontrado en la retina de varias especies de mamíferos (Brown y Makman, 1977; Schorderet y Mcdermed, 1978; Bodis-Wollner, 1990). La dopamina se encuentra también en retina de teleósteos (Brown et al., 1977) y el receptor D1 despliega sus propiedades características de acuerdo al modelo bioquímico de activación y respuesta fisiológica (Kebabian et al., 1986).

Poco se sabe acerca de los receptores D1 en el sistema nervioso de los mamíferos; tanto anatómica como bioquímicamente se

ha asociado a los receptores D1 con una fosfoproteína (DARPP-32) que posiblemente se encuentra presente en células que poseen receptores D1 y no asociada directamente a estos (Walaas y Greengard, 1984; Ouimet et al., 1984; Hemmings y Greengard, 1984). Se ha sugerido que la fosforilación de DARPP-32 conduce a una respuesta fisiológica indirecta al regular el estado fosforilado de otros sustratos de proteínas neuronales (Nestler y Greengard, 1984).

Se sabe que los receptores D2 se encuentran en la glándula pituitaria tanto en mamotropos como en melanotropos (Stoff y Keabian, 1984); en mamotropos los agonistas selectivos D2 inhiben la formación de AMP cíclico y la liberación de prolactina (Bach et al., 1980). Los agonistas D2 bloquean este efecto de los agonistas dopaminérgicos. En melanotropos del lóbulo intermedio, los agonistas D2 inhiben la formación de AMP cíclico y la liberación hormonal (Cote et al., 1983; Munemura et al., 1980).

De estudios in vitro se conoce que la liberación de dopamina puede ser inhibida por agonistas D2 y por la misma dopamina (Stoof et al., 1980; Starke et al., 1983; Kamal et al., 1981).

La dopamina es un neurotransmisor presente en el neocórtex. La dopamina liberada de las terminales nerviosas de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, puede ser modulada por muchas sustancias químicas incluyendo a la dopamina misma y drogas dopaminérgicas (Starke, 1980; Langer, 1981)

LY 141865 inhibe la liberación de la dopamina provocada eléctricamente o por alto potasio, en tanto que el SKF 38393 no tiene efecto alguno sobre esta provocación. El efecto de LY 141865 es antagonizado por (-)-Sulpiride y otras benzamidas (Starke et

al., 1983; Stoof et al., 1982). Sugiriendo la presencia de autorreceptores D2 en las terminales dopaminérgicas y corroborada posteriormente por estudios de union de ligandos radiactivos (Morelli, et al., 1988).

Existen evidencias de que autorreceptores dopaminérgicos localizados en las terminales y en el soma de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, modulan la cantidad de dopamina presente en el medio extracelular (Goldstein et al., 1973; Iversen et al., 1976; Westfall et al., 1976).

Cuando se estimulan los autorreceptores se deprime la actividad eléctrica de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, este efecto es bloqueado por neurolepticos (antagonistas dopaminérgicos) (Bunney et al., 1973; Guyenet et al., 1978).

Existe regulación dopaminérgica en la liberación de péptidos como la β -endorfina en el cerebro (Vermes et al., 1985). Y en el cuerpo carotideo de conejo se hallan presentes receptores D2 (Mir et al., 1984).

En el neostriado existen ambos receptores dopaminérgicos D1 y D2 (Lehman y Langer, 1983). Y su estimulación genera una conducta estereotipada y el estudio de esta conducta puede ser facilitado con el desarrollo de agonistas y antagonistas dopaminérgicos selectivos (Rosengarten et al., 1983; Molloy y Waddington, 1984) y la estimulación de receptores D1 induce conducta de giro en ratas con lesión unilateral en la vía nigroestriatal con 6-OH-Dopamina (Arnt y Hyttel, 1984; Gower y Marriot, 1982; Gershanick et al., 1983).

3. SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS.

Los sistemas neuronales que contienen dopamina son muy complejos en su anatomía, en su localización y en su aparente función, con respecto a otros sistemas catecolaminérgicos. La variación anatómica de los sistemas dopaminérgicos comprende desde sistemas de neuronas sin axones y con proyecciones muy restringidas (retina, bulbo olfatorio) hasta sistemas neuronales con arborizaciones extensivas (nigro estriatal). La principal diferencia morfológica entre el sistema noraepinefrínico y el sistema dopaminérgico es que los sistemas dopaminérgicos parecen ser sistemas "locales" con alta especificidad, y proyecciones organizadas topográficamente (Moore y Bloom, 1978).

El conocimiento de la anatomía, bioquímica y funciones de los sistemas dopaminérgicos: sistema nigroestriatal, el sistema mesolímbico y el sistema ventral tegmental-núcleo accumbens ha aumentado considerablemente en los años recientes. Estas investigaciones se han llevado a cabo, por impulso que se ha dado durante más de dos décadas. Al observarse que existe un déficit de dopamina, en pacientes con el mal de Parkinson y más recientemente con el hallazgo de que las drogas antiesquizofrénicas (drogas neurolepticas) son antagonistas dopaminérgicos (Hornykiewicz, 1978; Randrup, 1980), han contribuido a estas investigaciones. La dopamina juega un papel importante en la esquizofrenia, ya que altas dosis de estimulantes dopaminérgicos tales como la amfetamina pueden inducir psicosis en sujetos normales semejante a la paranoia esquizofrénica, y a dosis bajas puede exacerbar psicosis en pacientes que sufren de esquizofrenia (Hornykiewicz, 1978).

El sistema dopaminérgico nigro-estriatal tiene un papel crítico en la integración sensorimotora como se ha hecho evidente por numerosos estudios en animales, por ejemplo, la depletación del sistema dopaminérgico estriatal induce en animales hipocinesia, disfunción en la regulación postural, inatención a estímulos sensoriales y déficit en las conductas de la alimentación y de la toma de líquidos (Cools y van Rossum, 1980; Dunnet y Iversen, 1981; Kozlowsky y Marshall, 1980). También sistemas dopaminérgicos están involucrados en cambios en la actividad motora y en la conducta emocional (Scheel-Kruger, 1986; Salomone, 1991).

Las anfetaminas inducen en animales una conducta anormal y estereotipada característica, la cual se relaciona con los efectos sobre los receptores dopaminérgicos en el estriado y en el núcleo accumbens (Scheel-Kruger 1972; Scheel-Kruger et al., 1977b).

4 SUSTANCIA NIGRA.

4.1 ANATOMIA. La sustancia nigra es el núcleo mesencefálico más grande, se localiza dorsalmente a la cruz cerebri, y se extiende a lo largo del mesencéfalo. La sustancia nigra (SN) se estudia junto con los ganglios basales y el núcleo subtalámico debido a que hay una relación funcional y sináptica importante entre estas estructuras. Los ganglios basales son grandes masas de sustancia gris, derivados telencefálicos y relacionados con la función somato-motora. En el caso de los mamíferos se encuentran formados por el cuerpo estriado, que consiste de putamen, núcleo caudado y el globo pálido (Carpenter, 1984).

La sustancia nigra (SN) se divide en tres partes:

- i) La pars compacta o sustancia nigra compacta (SNC), región rica en células que contiene melanina.
- ii) La pars reticulata o sustancia nigra reticulata (SNR), región pobre en células y sin melanina.
- iii) La pars lateralis es una mezcla de ambas regiones en su porción anterior.

4.2 CITOLOGIA. Las células de la sustancia nigra son triangulares o fusiformes y miden de 15 a 50 μm (Rinvik y Grofova, 1970) en el gato y de 15 a 80 μm en el mono (Schwyn y Fox, 1974). Se han descrito tres tipos de células en la SN en la rata: 1) neuronas grandes distribuidas en la sustancia nigra reticulata, 2) neuronas medianas en la sustancia nigra compacta, y 3) neuronas pequeñas, con axón corto que se encuentran en ambas regiones. Las neuronas grandes que se localizan en la SNR, especialmente se agrupan en

las regiones rostralaterales y están embebidas en neuropilias de fibras no mielinizadas. Las neuronas de tamaño medio se encuentran agrupadas muy estrechamente en la SNC, aunque separada por finas envolturas de astrocitos. Pequeñas neuronas de 10 a 15 μm consideradas como interneuronas, integran un 10% de la SNC y un 40% de la SNR.

Se ha demostrado que las neuronas de la sustancia nigra vistas en preparaciones con la técnica de Golgi, dan origen a dendritas de gran radiación, lisas y con pocas ramas (Rinvik y Grofova, 1970). Las dendritas de las células de la SNC tienen una orientación dorsoventral principalmente; las dendritas de las células de la SNR tienen una orientación rostrocaudal y se sobrelapan con las dendritas de la SNC. Aunque los axones de neuronas nigrales son difíciles de impregnar por medio de la técnica de Golgi, estructuras semejantes se han observado que originan finas colaterales en ángulo recto al axón principal.

4.3 RELACIONES DE LA SUSTANCIA NIGRA:

4.3.1 FIBRAS AFERENTES DE LA SUSTANCIA NIGRA. La sustancia nigra recibe fibras aferentes del estriado, del globo pálido, del núcleo subtalámico, del núcleo dorsal del rafé y del núcleo pedúnculo pontino. Además, el núcleo accumbens proyecta topográficamente sobre ambas divisiones de la sustancia nigra (Swanson y Cowan, 1975; Nauta et al., 1978). Las proyecciones aferentes más importantes de la SN y más abundantes son las que proyecta el núcleo caudado y el putamen (Voneida, 1980; Szabo, 1970). Casi todas estas fibras estriadonigrales terminan y hacen

sinapsis en la SNR (Grofova y Rinvik, 1970; Kemp, 1970; Schwyn y Fox, 1974; Hattori et al., 1975). La proyección o vía estriadonigral se origina de neuronas estriatales espinosas de tamaño medio (Grofova, 1975) que tienen como sus neurotransmisores al GABA, la encefalina (DiFiglia et al., 1982) y la sustancia P (Groves, 1983). La proyección del globo pálido a la sustancia nigra es relativamente menor comparado con la proyección estriadonigral y se consideran como sus neurotransmisores al GABA y la sustancia P (Hattori et al., 1973; Fonnum et al., 1974, 1978; DiFiglia et al., 1981). Se han mostrado evidencias de que la vía pálido-nigral terminan principalmente en la SNC y con gran distribución sobre neuronas dopaminérgicas (Hattori et al., 1975; Bunney y Aghajanian, 1976).

Las fibras que recibe la sustancia nigra del núcleo subtalámico, terminan principalmente en la SNR (Kannazawa et al., 1976; Carpenter et al., 1981a). El neurotransmisor de las fibras subtalámiconigrales es el ácido glutámico (Kita y Kita, 1987).

La sustancia nigra recibe una proyección del núcleo raquídeo en particular de la parte dorsal y termina en la SNR según varios estudios (Kuhar et al., 1972; Dray et al., 1976; Kanazawa et al., 1976; Bunney y Aghajanian, 1976; Carpenter et al., 1981a), es probable que el neurotransmisor principal de esta proyección raquídeo-nigral sea la serotonina (Descarries et al., 1982).

Respecto al núcleo pedúnculo-pontino también proyecta a la sustancia nigra. La sustancia nigra recibe más fibras del núcleo pedúnculo-pontino que las que este manda al globo pálido o al núcleo subtalámico (Carpenter et al., 1981a), el neurotransmisor es la acetil colina y termina en la SNC (Beninato, 1988).

4.3.2 FIBRAS EFERENTES DE LA SUSTANCIA NIGRA. Las fibras eferentes se agrupan en dos clases: aquellas que son dopaminérgicas y aquellas que son no-dopaminérgicas. La vía nigroestriatal es la más grande y la más extensamente estudiada de las proyecciones, y se distribuye en casi todo el estriado (ver rev. Carpenter, 1984). Esta vía está formada por fibras dopaminérgicas que se originan en la SNC (Anden et al., 1984; Ungerstedt, 1971). Aunque se sabe que la dopamina es el neurotransmisor de la vía nigroestriatal, no se ha podido establecer cual es su acción posináptica, ya que se han mostrado evidencias de efectos excitatorios (Kita et al., 1976; Wilson et al., 1982) y de efectos inhibitorios (Connor, 1970; Gonzalez-Vegas, 1974). Puesto que las neuronas estriatales tienen los dos tipos de receptores D1 y D2 (Calabresi, 1987; Akaike, 1987; Reid, et al., 1990) es probable que el efecto de la dopamina dependa de la concentración y del tipo de receptor que se active. Virtualmente el resto de las fibras eferentes nigrales se originan de las células de la SN reticulata y constituyen en gran parte el sistema de salida del control motor (Penny y Young 1985) extrapiramidal. Estas pueden ser agrupadas como: fibras nigrotalámicas, fibras nigrotectales y fibras nigrotegumentales. Los dos primeros grupos son de naturaleza GABAérgica (DiChiara et al., 1979).

Una de las mayores proyecciones de la SN reticulata es dirigida hacia el núcleo talámico, a la región ventral anterior, ventral lateral y la medial de este núcleo (Carpenter y Peter, 1972). También una población de neuronas de la SN reticulata proyecta axones colaterales que divergen hacia el núcleo pedúnculo pontino y hacia el colículo superior (Bentivoglio et al., 1979).

Además la proyección nigrotalámica y la proyección palidotalámica ejercen una fuerte influencia sobre los patrones de disparo de las neuronas de la vía talamocortical (Kultas-Ilinsky et al., 1983).

De diferentes estudios se sabe que la vía nigro-tectal se origina de células de la SNR y termina en el colículo superior (Rinvik et al., 1976; Graybiel, 1978) y se ha sugerido que son fibras GABAérgicas (Grofová et al., 1978). También se la ha relacionado con una variedad de respuestas auditivas y visuales con respuestas de conducta de orientación, fijación de la atención y de la percepción (Hikosaka y Wurtz, 1983, 1983a, 1983b).

Por último, se sabe que algunas fibras del haz nigrotegmental terminan en el núcleo pedúnculo pontino y son no-dopaminérgicas actualmente se desconoce el papel funcional de estas fibras (Carpenter et al., 1981a).

5. LIBERACION DENDRITICA DE DOPAMINA EN LA SN.

La existencia de dopamina en dendritas de la sustancia nigra compacta se descubrió primero por Bjorklund y Lindvall en 1975. Del contenido total de dopamina de la SN, un 30-40 % se encuentra en la SNR y el resto en la SNC (Dray, 1980). La liberación provocada de dopamina en la SN por estimulación eléctrica (Aceves y Cuello, 1981) y por una alta concentración de K^+ (Geffen et al., 1975) es dependiente del Ca^{++} . También es liberada la dopamina por estimulación con veratridina en la SN (Tagerud, S.O.E., and Cuello, A.C., 1979). Respecto al origen de la dopamina liberada dendriticamente en la SN se piensa que proviene probablemente del retículo endoplásmico, ya que no se han observado vesículas sinápticas en las dendritas de las neuronas dopaminérgicas (Wassief et al., 1981). La liberación de otros neurotransmisores entre ellos GABA en SN puede ser obtenido por estimulación eléctrica, alto potasio o por veratridina (Aceves y Cuello, 1981).

Estudios microelectroforéticos han mostrado que la dopamina y los agonistas dopaminérgicos en la SN inhiben la actividad de las células dopaminérgicas (Bunney et al., 1973). Es decir estos agonistas disminuyen la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas y se piensa que este efecto está mediado por receptores D_2 (autorreceptores) (Bunney et al 1973; Meneu et al., 1984; Pinnock, 1983; Walters et al., 1986).

En la sustancia nigra reticulata las células son relativamente insensibles a la dopamina y a la fecha no se ha podido mostrar la presencia de receptores dopaminérgicos en estas neuronas. Sin embargo por estudios de receptor ligando se ha encontrado una alta densidad de receptores D_1 en esta parte del

núcleo (Filloux et al., 1987; Barone et al., 1987; Aiso et al., 1987; Porceddu et al., 1986), estos receptores parecen estar localizados en las terminales GABAérgicas estriatales que llegan a este núcleo. El papel funcional de estos receptores no ha sido aclarado aún y se desconoce si la dopamina liberada de las dendritas es capaz de activarlos. Estudios farmacológicos sugieren que la adenilato ciclasa sensible a la dopamina se encuentra localizada sobre neuronas GABAérgicas en la SN (Premont et al., 1976).

La dopamina liberada de las dendritas parece formar una proyección nigro-nigral (de la pars compacta a la pars reticulata) usando dendritas en lugar de axones, las cuales hacen sinapsis con los axones estriatales, originando una verdadera proyección nigro-nigral.

Es ampliamente reconocido que la liberación dendrítica de dopamina en la sustancia nigra puede ejercer una influencia autorregulatoria de las mismas neuronas dopaminérgicas (Aghajanian y Bunney, 1977; Filloux et al., 1987; Beckstead, 1988; Porceddu et al., 1985). Pero también es posible que la dopamina liberada dentro de la SN tenga influencia sobre los otros elementos neuronales en esta región (Van der Heyden et al., 1980). Respecto a esto último, estudios de registro unitario han tratado de evidenciar el papel de la dopamina como regulador de la función de las neuronas de salida de la SNR, sin lograr establecerlo adecuadamente (Ruffieux y Schultz, 1980; Waszczak y Walters, 1983, 1984).

Como se observa hay discusión acerca del papel funcional de la dopamina liberada por las dendritas en la sustancia nigra.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen tres líneas de investigación que tratan de dilucidar el papel funcional de la dopamina liberada en la SN.

La primera de estas sugiere que la dopamina activa un autorreceptor somato-dendrítico que controla el disparo neuronal. Por otra parte la segunda línea de investigación propone que la dopamina modula la acción inhibitoria de GABA y de la vía estriatonigral sobre las neuronas Gabaérgicas de proyección de la pars reticulata atenuándola. Esto se basa en estudios en que la dopamina parece estimular la tasa de disparo de las células de la SNR y atenuar la respuesta inhibitoria a GABA de estas células (Waszczak y Walters, 1983). A pesar de esto no se conoce el receptor involucrado, ni el mecanismo de modulación.

Una tercera hipótesis propone que la dopamina tiene un efecto presináptico de modulación de la liberación de GABA. hipótesis de que es objeto este trabajo.

Aun cuando existen reportes o estudios sobre los receptores presinápticos, en estos no se ha dilucidado satisfactoriamente su funcionamiento ya que se desconoce si la dopamina liberada de las dendritas (endógena) actúa sobre los receptores de las terminales estriatonigrales de la SNR. Esto puede deberse a que se encuentran pocos o escasos estudios sobre la modulación de la liberación de GABA en SNR, se ha desarrollado una gran variedad de técnicas experimentales y las dificultades propias de la interpretación de resultados de estudios de estos receptores, no han aclarado el funcionamiento.

La importancia del estudio de los receptores presinápticos D1

resalta si se tiene en cuenta que la sustancia nigra interviene en el control motor y de la postura (DeLong, 1990) . Esta se lesiona con la enfermedad de Parkinson. De aquí que cualquier contribución al estudio de los receptores D1 en la SN, puede contribuir a un mejor conocimiento de la fisiología de este importante núcleo, así como brindar mejores alternativas terapéuticas a estos pacientes.

La presente tesis esta dedicada al estudio de los receptores presinápticos D1 activados por dopamina endógena y que modulan la liberación de GABA, principal neurotransmisor de la sustancia nigra. También hay que señalar que son muy importantes los modelos de funcionalidad de las estructuras nerviosas y los resultados de este trabajo contribuyen a la estructuración de un modelo de funcionalidad del fenómeno de liberación dendrítica, poco estudiado en la biología moderna.

HIPOTESIS DE TRABAJO:

La existencia de liberación dendrítica de dopamina en la sustancia nigra (SN) (Geffen et al, 1976) y la presencia de receptores presinápticos D1 sobre sus aferentes GABAérgicas (Ribak, et al.,1980), nos indica que la dopamina endógena modula presinápticamente la liberación de GABA de la pars reticulata de la sustancia nigra.

OBJETIVOS.

Objetivo General.- Probar que la dopamina liberada dendriticamente modula la liberación de GABA en la pars reticulata de la sustancia nigra de la rata.

Objetivos particulares:

- 1). Estudiar el efecto de antagonistas selectivos de los receptores dopaminérgicos sobre la liberación de GABA inducida por potasio, en SNR de ratas normales y en ratas denervadas de la vía nigro-estriatal unilateral.
- 2). Estudiar el efecto de drogas que movilizan dopamina de compartimientos endógenos (como la metanfetamina), para ver si la dopamina de las dendritas es capaz de activar los receptores presinápticos.
- 3). Estudiar el efecto de la dopamina en la pars reticulata de la sustancia nigra de ratas normales y ratas con lesión unilateral de la pars compacta por 6-Hidroxi-dopamina eliminando así efectos de la dopamina endógena que pudiera liberarse durante la depolarización usada para inducir la liberación de GABA.
- 4). Aclarar el efecto de la dopamina sobre la liberación de GABA para entender la interacción presináptica de ambos receptores (D1 y D2).

MATERIAL.

a) Los animales de experimentación fueron ratas macho de la raza Wistar cuyo peso osciló entre 250 y 300 gramos, los cuales se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada, ciclos de luz/oscuridad (de 12 horas cada etapa) y libre acceso a agua y alimento, mientras no estuvieron en sesiones experimentales. Se usaron dos grupos de animales experimentales (ratas normales y ratas con lesión cerebral de la vía dopaminérgica nigro-estriatal con 8-Hidroxidopamina con peso de 200 a 220 grs. al momento de la lesión) para experimentos de liberación. Previo a estos se realizaron selecciones de individuos mediante evaluaciones conductuales del grupo de ratas con lesión cerebral, 30 minutos y 7 días después de la lesión. Al momento de realizar el experimento de liberación de GABA con ratas denervadas se hizo una previa evaluación histológica para seleccionar las muestras con la implantación de la lesión en el sitio requerido.

b) Soluciones.

1). Solución de Krebs- Hanslein normal (mM/l).

NaCl	134.00
KCl	5.00
CaCl ₂	2.00
MgSO ₄	1.00
KH ₂ PO ₄	1.25
NaHCO ₃	25.00
GLUCOSA	10.00
Ac. amino-oxiacético	0.01

La solución de Krebs normal se prepara mezclando lo anterior excepto cloruro de calcio (CaCl_2) y burbujeada con carbógeno (mezcla de oxígeno 95% y dióxido de carbono 5%) 20 minutos después se le añade CaCl_2 al estar burbujeada la muestra. Durante todo el tiempo que duró el experimento se mantuvo la temperatura de 37°C a esta solución y a un pH de 7.4 .

ii) Solución de Krebs despolarizante (15 mM de potasio). Para tal solución la concentración de NaCl se mantuvo constante con respecto a la solución de Krebs normal, es decir que la disminución de Cl^- , se sustituyó con SO_4^{--} en la forma de Na_2SO_4 y de K_2SO_4 . La osmolaridad se mantuvo añadiendo sacarosa y la solución se obtuvo a partir de soluciones madres al igual que la solución de Krebs control. La mezcla de la solución despolarizante fue la siguiente.

SOLUCION DE KREBS (15mM de K^+)	
NaCl	55.58
Na_2SO_4	39.21
K_2SO_4	6.87
CaCl_2	2.00
MgSO_4	1.00
KH_2PO_4	1.25
GLUCOSA	10.00
Ac. amino-oxiacético	0.01

Se les agregó a las soluciones de Krebs normal y despolarizante el ácido nípecótico ($10 \mu\text{M}$) durante todo el tiempo de perfusión. El meta-sulfito de sodio es un agente antioxidante que se le añadió a la solución de dopamina a una concentración de

50 μ M.

iii) Líquido de centelleo (por litro de solución).

Tolueno	857.0 ml
Triton X-100	333.0 ml
P. P. O. (*)	4.0 mg
P. O. P. O. (**)	200.0 mg

*) 2,5-Difeniloxazol

***) 1,4-bis-2-(5-feniloxazol)-benceno

La eficacia del líquido al espectrómetro fue de 55% y la radioactividad se determinó por estandarización externa.

c) DROGAS.

i) [3 H]-GABA con actividad específica de 85 Ci/mol fue obtenido del Centro Radioquímico, Amershan, Inglaterra. Se mantuvo en refrigeración (4 °C) hasta el momento de usarse.

ii) β -alanina fue adquirida de la Compañía Química Sigma. Se disuelve en agua por lo que se preparó una solución madre 10^{-3} M y se conservó a 4 °C.

iii) Ácido nípecótico se obtuvo de Sigma. Se disuelve en agua.

iv) Dopamina de Sigma se agregó directamente a la solución de Krebs en presencia de meta-bisulfito de sodio a una concentración de 50 μ M.

v) SCH-23390 adquirida de R.B.I. Se preparó una solución madre en agua a una concentración de 10^{-3} M, de la se que se tomó al momento de usarse y agregarse a la solución de Krebs en presencia de meta-bisulfito de sodio como agente antioxidante.

vi) Sulpiride se obtuvo de Sigma. Se preparó una solución madre

10⁻⁴M en Krebs y al momento de su uso se tomó de dicha solución.

vii) D-l-metamfetamina adquirida por medio de Sigma. Se preparó una solución salina al 9% que se administró subcutáneamente y en experimentos de liberación se adicionó directamente a la solución de Krebs al momento de su uso y a la concentración deseada.

viii) Meta-bisulfito de sodio de Baker. Se añadió a la solución de Krebs al momento del experimento y a la concentración de 50 μ M.

d) Dispositivo experimental.

El dispositivo requerido para coleccionar fracciones de líquido con radioactividad liberada de cortes finos de tejido nervioso o rebanadas de pars reticulata de la sustancia nigra de rata normal y de rata lesionada, estuvo integrado por el sistema de perfusión que a continuación se menciona.

El sistema de perfusión lo forman 8 cámaras en paralelo y los siguientes aparatos (ver fig. 2):

i) Bomba peristáltica (Cole-Parmer). Bomba encargada de propulsar las soluciones que bañan los tejidos dentro de las cámaras a través de catéteres conectados a la entrada y a la salida de ellas.

ii) Aparato regulador de la temperatura. Este aparato lo forman los catéteres enserpentinados y sumergidos en un baño de agua a una temperatura constante de 37 °C, la cual se mantuvo por medio de una resistencia y un termostato. Con esto se logró que las soluciones y las cámaras se mantuvieran a 37 °C, durante todo el experimento.

iii) Cámaras de perfusión. Estas lo forman dos cilindros huecos, uno de los cuales funciona como contenedor de la cámara cilíndrica

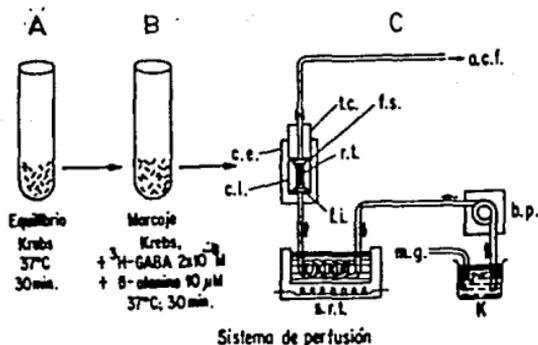


Figura 2. Representación esquemática de la etapa de equilibrio-marcaje del procedimiento y del dispositivo experimental mediante al que fueron sometidos las rebanadas de reticulata de la sustancia negra. A y B representan los periodos de equilibrio y de marcaje con ^3H -GABA. C representa el sistema de perfusión: r.t. rebanadas de tejido nervioso, f.s. filtro superior, f.i. filtro inferior, c.i. cámara interior, c.e. cámara exterior, t.c. tapón de la cámara, K solución de Krebs, m.g. mezcla gaseosa, b.p. bomba peristáltica, s.r.t. sistema regulador de la temperatura, a.c.f. colector de fracciones. Las flechas pequeñas indican el curso de del líquido de perfusión que parte de la solución de Krebs y termina en el colector de fracciones.

de 2.2 mm de diámetro y de 10 mm de largo, en el fondo de esta se colocó una malla fina de nylon para sostener y mantener al tejido dentro de la cámara con el fin de evitar la pérdida del tejido. Además este primer cilindro, tiene espacio para contener a otro cilindro con filtro, que embona en este espacio. Ambas se sellaron con grasa de silicón, para no tener pérdidas de líquido de perfusión.

iv). Aparato colector de fracciones (LKB ultrorac II). Este aparato colectó fracciones de líquido perfundido cada 4 minutos, con una velocidad de 0.5 ml/min.

MÉTODOS.

1. Lesión de vía dopaminérgica nigro-estriatal de SN de rata.

Para los experimentos en que se utilizaron rebanadas de sustancia nigra reticulata en las cuales se hubieran degenerado las dendritas dopaminérgicas derivadas de la sustancia nigra compacta fue necesario, producir denervación de la vía nigro estriatal mediante lesión química de la pars compacta de la sustancia nigra, aplicando quirúrgicamente 8-hidroxidopamina (Hattori, 1979).

La obtención de la denervación unilateral de la vía nigro estriatal, se obtuvo mediante la lesión química de las neuronas de la sustancia nigra compacta como ya se mencionó aplicando 8-hidroxidopamina una toxina que destruye selectivamente neuronas dopaminérgicas. La lesión se efectuó en ratas que pesaron entre 200-220 gramos, las cuales fueron anestesiadas con hidrato de cloral (400 mg/Kg de peso) y montadas en el estereotáxico en donde se fijó la cabeza y se realizó un corte sagital en la piel del cráneo de la rata; una vez expuesto el cráneo y tomando a las fisuras Bregma como el origen de coordenadas o cero, se implantó en el punto de las coordenadas 2.2 mm lateral y 5.5 mm posterior, en este punto se trepanó el cráneo produciéndole un orificio de 1.5 mm de diámetro. En este lugar se introdujo un cánula de perfusión lenta a una profundidad de 7.2 mm a partir de la duramadre conectada a una jeringa Hamilton (se purgó y se infiltró 5 μ l de solución de 8-hidroxidopamina). Estas coordenadas se obtuvieron previamente de ratas a las cuales se les inyectó azul de metileno y se corroboró histológicamente el sitio de

implantación. Se inyectaron 2 μ l de solución de 6-hidroxi-dopamina (6 μ g/ μ l disuelta en solución salina isotónica y 0.02 % de ácido ascórbico como agente antioxidante) la perfusión se realizó a una velocidad de 1 μ l/min. Después de extraer la cánula, se suturó tanto los músculos por planos y la piel. Posteriormente se observó que a los treinta minutos después de la cirugía, las ratas mostraron una postura asimétrica y una conducta de giro contralateral.

2. Evaluación de la lesión.

a). Evaluación conductual 1. Los animales lesionados mostraron postura asimétrica y conducta de giro espontáneo ocasional, inmediatamente al despertar de la anestesia. Esto indica que la aplicación de 6-hidroxi-dopamina fué en la pars compacta de la SN.

b). Evaluación conductual 2. A la semana de la aplicación de la toxina, los animales recibieron una inyección de d-l-metanfetamina (10 mg/Kg) y una hora después se procedió a evaluar la conducta de giro ipsilateral producido por la droga, evaluando que con 12 giros completos por minuto equivale al 90% de lesión (Ungerstedt, 1971a). Se describió a las ratas que presentaron una menor cantidad de 12 giros/min.

c). Evaluación histológica. Dos semanas después de la lesión se realizaron los experimentos de liberación con los animales seleccionados y al disecar la pars reticulata de la sustancia nigra se observó bajo el microscopio estereoscópico la marca de la trayectoria de la cánula sobre el tejido de la sustancia nigra compacta, descartándose aquellas ratas que presentaron la punta de la cánula fuera de la pars compacta de la SN por considerarse que

la lesión no se efectuó en la región deseada del cerebro de la rata.

3. Disección de la pars reticulata de la SN.

Para los experimentos de liberación se obtuvieron rebanadas de sustancia nigra obtenidas de ratas (8 por experimento) Wistar macho de 250-300 gramos de peso (ratas normales y ratas con lesión unilateral del sistema dopaminérgico nigro estriatal). Los individuos se sacrificaron por dislocación cerebral, seguido por decapitación y obtención del cerebro completo. Se obtuvo la porción que incluía la sustancia nigra, según el Atlas de Koning y Klippel (1970) esta se encuentra aproximadamente entre 1600 y 2580 μm del plano frontal, se fijó esta parte en un soporte metálico el cual se introdujo en un vibratomo (Oxford, Mod. B) que contenía en el sitio de corte solución de Krebs-Hanselein a 4 grados centígrados y gasificada con una mezcla de oxígeno O_2 (95%) y dióxido de carbono CO_2 (5%). Se obtuvieron de 3 a 4 cortes seriados de cerebro de 300 μm en el plano frontal de la porción que contenía la sustancia nigra. Los cortes se montaron sobre un portaobjetos frío utilizando microscopio estereotáxico y con bisturí se diseccionó la reticulata de la sustancia nigra.

4. Procedimiento experimental.

Las rebanadas de pars reticulata de sustancia nigra se colocaron inmediatamente después de su disección en una solución de Krebs-Hanselein a 37 °C durante 30 minutos (periodo de equilibrio I). Al término de este periodo, se procedió a reemplazar la solución de Krebs por una solución fresca que contiene 2×10^{-8} M. de H^3 -GABA (65 Ci/nmol) y β -alanina (1 μM)

como bloqueador de la captura glial, durante 30 minutos (periodo de marcaje). Después se lavaron las rebanadas con solución fresca de Krebs-Hanselein, para eliminar el exceso de marcaje radioactivo, y a continuación dichas rebanadas se transfirieron al sistema de perfusión continua (Aceves y Cuello, 1981).

Al término del periodo de marcaje las rebanadas se colocaron al azar dentro de las cámaras. En cada cámara se depositaron 3 a 4 rebanadas de sustancia nigra reticulata, cuyo peso húmedo aproximado fué de 10 mg. En estas condiciones el tejido se perfundió durante una hora (periodo de equilibrio II), con solución de Krebs normal (8.25 mM de K^+), antes de iniciar el experimento de liberación de GABA. Esta solución contenía ácido nipecótico (5-10 μ M) que es un bloqueador de la captura de GABA en las terminales nerviosas y en las células gliales (Krogsgard-Larsen y Jhonston, 1975).

En la evaluación de la liberación espontánea de GABA, se sometió a los tejidos a un periodo de equilibrio II durante 1 hora y 16 minutos, a continuación se tomaron fracciones de solución perfundida (en las que iba el neurotransmisor liberado) de 4 minutos durante 80 minutos (en total fueron 20 fracciones).

Por otra parte los tejidos sometidos a una concentración de K^+ de 15 mM (alto potasio) se les deja un periodo de equilibrio II por una hora y en seguida se colectaron cuatro fracciones de medio perfundido de 4 minutos cada una para determinar la liberación basal de GABA. La solución de alto potasio con KCl constante, generó la liberación de GABA radiactivo por depolarización de las terminales gabaérgicas, esta estimulación duró 80 minutos.

De las drogas que se probaron en las muestras para la liberación de GABA expuestas a alto potasio, primero se tomaron cuatro fracciones durante los primeros 16 minutos de perfusión. al término de este lapso de tiempo se le aplicó un pulso de la droga a probar (por ejemplo anfetamina) según el experimento, colectándose 8 fracciones durante 32 minutos. Después de esto se regresó a la solución de Krebs normal por 32 minutos más (8 fracciones) y a continuación se recuperó el tejido de las cámaras. Este se transfirió a viales agregándoles 0.5 ml de solubilizador de tejidos (NCS Amersham).

El tejido se dejó solubilizando 30 minutos; después se añadieron 12 ml de líquido de centelleo tipo tolueno a los viales del sistema, así como a los que contenían las fracciones de liberación, en seguida se determinó la radioactividad presente en las muestras mediante el uso de un espectrómetro de centelleo de líquido convencional (Packard 2000).

5. Análisis de resultados.

La cuantificación de la radioactividad en cada fracción de las muestras tomada cada cuatro minutos, se expresó como un cociente de la radioactividad de la muestra entre la radioactividad del tejido correspondiente al momento de la colección de aquella, y a este cociente se le denomina fracción de liberación (F.L.); en el caso de la cuantificación de las muestras expuestas a alto potasio al cociente de liberación se le denomina fracción de liberación estimulada (F.L.E.) y el cociente para muestras no expuestas a alto potasio recibe el nombre de fracción de liberación basal (F.L.B.), los cuales se pueden expresar de la siguiente manera;

Radioactividad de la muestra
expuesta a alto potasio (DPM)

$$F.L.E. = \frac{\text{Radioactividad del tejido al momento de tomar la muestra (DPM)}}{\text{Radioactividad de la muestra expuesta a alto potasio (DPM)}}$$

fracción representativa de la liberación basal y la inducida por K^+
y

Radioactividad de la muestra no
expuesta a alto potasio (DPM)

$$F.L.B. = \frac{\text{Radioactividad del tejido al momento de tomar la muestra (DPM)}}{\text{Radioactividad de la muestra no expuesta a alto potasio (DPM)}}$$

fracción que representa la liberación basal exclusivamente
DPM = Desintegraciones por minuto.

La parte de la liberación debida exclusivamente al efecto del
alto K^+ se determinó a partir de la siguiente ecuación.

$$F.L. = (F.L.E.) - (F.L.B.)$$

Para determinar el efecto de las drogas se cuantificó la
relación de la fracción de la liberación de las rebanadas
expuestas a la(s) droga(s) (anfetamina, dopamina, SCH-23390,
sulpiride) y la fracción de la liberación no expuesta, pero que
corrieron paralelamente a aquellas. Tal relación se le denominó
coeficiente de la fracción de la liberación (C.F.L.).

B. Análisis estadístico.

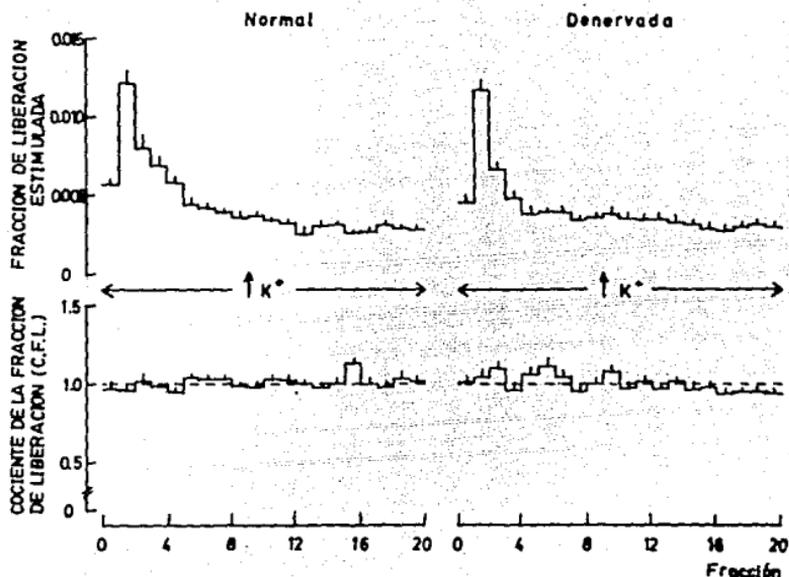
A los resultados de los experimentos de liberación de GABA se
les aplicó un análisis de varianza. Y la significancia del efecto
de agonistas y antagonistas dopaminérgicos se mostró mediante una
prueba de t-student para datos pareados, considerando que la
diferencia del promedio de las observaciones antes y después de la
aplicación de las drogas no difiere de cero (hipótesis nula). Para
comparar los efectos de las drogas entre sí durante los periodos
de prueba, su significancia se obtiene por medio de la prueba de
student para datos no apareados de los promedios durante la
aplicación de la droga.

RESULTADOS.

1. Liberación de GABA radiactivo inducida por alto potasio en la pars reticulata de sustancia nigra de ratas normales y de ratas denervadas.

En la gráfica 1 se muestra la liberación de GABA radiactivo inducido por despolarización continua de K^+ a una concentración de 15 mM (alto potasio, que representa casi tres veces la concentración normal de potasio) en la pars reticulata de ratas normales y denervadas. Al comparar la liberación de rebanadas de la pars reticulata de sustancia nigra de ratas normales y de ratas denervadas, se observó que la continua exposición a la despolarización produjo una prolongada liberación de radiactividad, como lo muestra aquí el incremento de la fracción de liberación. Al principio hubo un incremento significativo en forma transitoria en las fracciones 1 y 2 el cual disminuyó lentamente al transcurrir el tiempo, pero siempre por arriba de la liberación basal que en el gráfico corresponde a cero. No encontramos diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos (C.F.L. = 1.05 ± 0.04 , $n=50$ para las ratas normales y C.F.L. = 1.03 ± 0.06 , $n=30$ para las ratas denervadas).

En la parte inferior se graficó el cociente de la fracción de la liberación o la relación en el incremento de la fracción de la liberación del grupo experimental con respecto al grupo control seleccionados al azar (Nota en este caso al grupo experimental no se le efectúa ninguna manipulación ya que es un control para las maniobras experimentales), el cual osciló alrededor de uno. Esto



Gráfica 1. Liberación de GABA radiactivo inducido por 15 mM de K⁺ obtenida de rebanadas de la pars reticulata de sustancia nigra de ratas normales y denervadas. La estimulación se mantuvo durante 80 minutos desde t=0 y se colectaron 20 fracciones de 4 minutos cada una. En la parte superior se muestra la liberación de radioactividad como cambio de la fracción de liberación (Estimulada-Basal). En la parte inferior se muestra el coeficiente de liberación (C. F. L.) correspondiente a 25 pares de valores para reticulata de rata normal y 15 pares de valores para reticulata de rata denervada. Los pares de valores fueron tomados al azar de los valores correspondientes de las gráficas superiores. Los valores representan el promedio de 30 determinaciones para normales y 30 para denervadas (C.F.L. = 1.05 ± 0.04 n=25 para ratas normales y C.F.L. = 1.03 ± 0.08 n=15 para ratas denervadas).

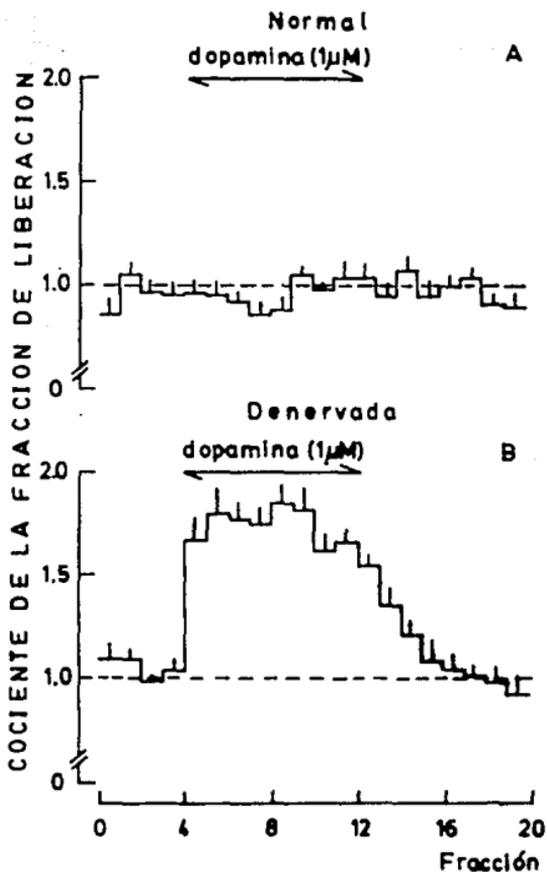
nos indica que la liberación de ^3H -GABA es homogénea en las rebanadas estimuladas con alto potasio, tanto de ratas normales como denervadas.

La cuantificación de este parámetro (cociente de la fracción de liberación) servirá para determinar y caracterizar los efectos producidos por agonistas y antagonistas dopaminérgicos sobre la liberación de (^3H)-GABA.

2. Efecto de la dopamina exógena sobre la liberación de GABA inducida por alto potasio en la pars reticulata de ratas normales y denervadas.

En estos resultados se muestra la acción de la dopamina ($1 \mu\text{M}$) exógena sobre la liberación de GABA inducida por potasio (ver gráfica 2). Aparentemente en rebanadas de SN de ratas normales no modificó la liberación de GABA inducido por potasio (C.F.L. = 0.98 ± 0.01 , $n=4$ $p=0.001$), como se puede observar en la parte A de la gráfica 2. En la parte B mostramos que la aplicación de dopamina a rebanadas de ratas denervadas incrementó la liberación de GABA radiactivo en un 75% (C.F.L. = 1.76 ± 0.04 , $n=5$ $p=0.001$), el incremento fue inmediato a la administración de la droga y al retirarse ésta del medio, el efecto se revertió paulatinamente.

Los resultados de la gráfica 3 son producto de una serie de experimentos en la que se muestra el efecto de la dopamina sobre la liberación de GABA inducida por alto potasio (línea continua) en rebanadas de ratas denervadas en donde también se estudió el bloqueo de los receptores D1 y D2 en muestras corridas en paralelo, para determinar el tipo de receptor involucrado. La



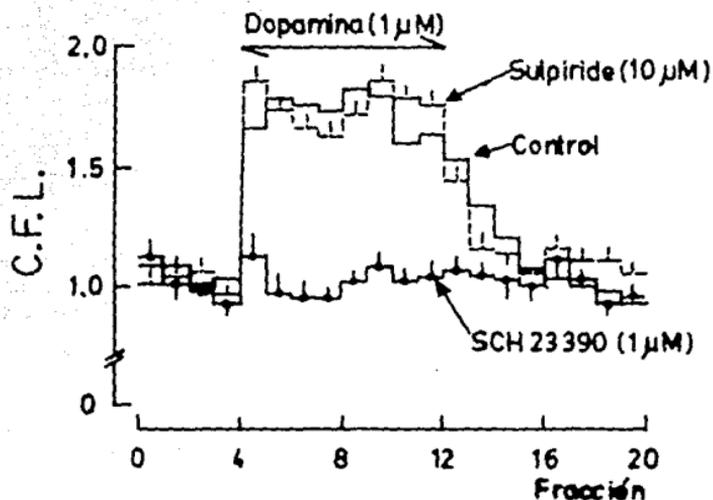
Gráfica 2. Efecto de la dopamina exógena sobre la liberación de GABA radiactivo inducida por alto potasio en rebanadas de reticulata de ratas normales y de ratas denervadas. La administración de la dopamina se realizó en forma de pulso a partir de la fracción 4 y se mantuvo hasta la fracción 12 en donde se eliminó la droga. Los valores son el promedio de 8 determinaciones \pm error estándar.

presencia del antagonista selectivo de los receptores D2 1-sulpiride (10 μ M no modificó la facilitación de la liberación ejercida por la dopamina (C.F.L. = 1.75 ± 0.03 , sin diferencia estadística respecto al control y el grupo tratado solo con dopamina). La línea continua con círculos negros representa los valores de muestras corridas en paralelo con bloqueo selectivo de receptores D1 por el SCH-23390 (1 μ M el que antagonizó totalmente el efecto facilitador de la dopamina (C. F.L. = 1.00 ± 0.03 , $p=0.01$ n=4 para el grupo tratado con dopamina solo).

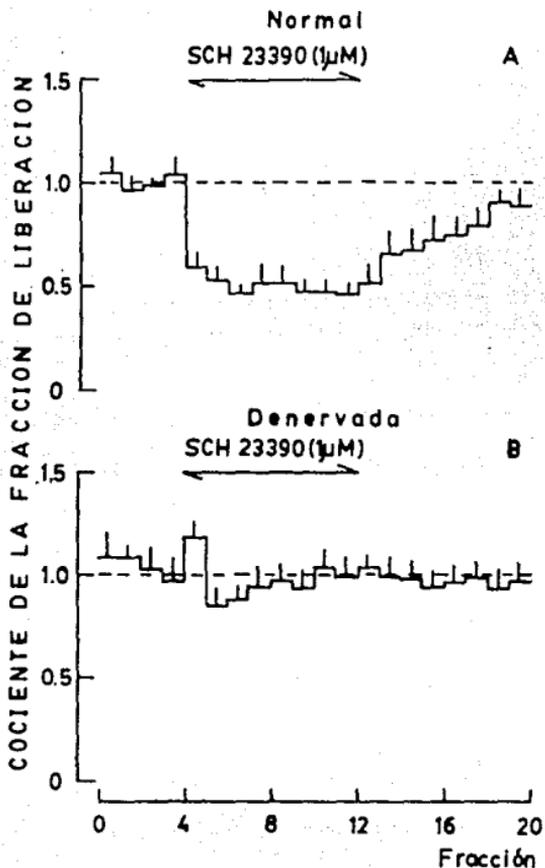
3. Efecto de los antagonistas de receptores dopaminérgicos D1 sobre la liberación de GABA inducida por K' en rebanadas de ratas normales y de ratas denervadas.

En la gráfica 4 se muestra resultados del efecto del antagonista de receptores D1 SCH-23390, sobre la liberación de GABA radiactivo en rebanadas de ratas normales y de ratas denervadas. Esto bajo el supuesto de que la estimulación con K' en ratas normales produce la liberación de dopamina dendrítica además de GABA radioactivo.

En la parte A se muestra que la droga produjo (ratas normales) una inhibición del 50% aproximadamente de la liberación al administrar a manera de pulso a la concentración de 1 μ M (C.F.L. = 0.51 ± 0.01 , n=8 $p=0.001$) con respecto al control. Después de retirado el fármaco del medio de perfusión la liberación se recuperó paulatinamente, como se puede ver en las fracciones 12-20 de la gráfica.



Gráfica 3. Efecto facilitador de la activación de los receptores D1 de la liberación basal de GABA radiactivo en pars reticulata de rata denervada. En la parte superior se muestra la facilitación de la dopamina (línea continua) sobre la liberación de [³H]-GABA inducido por K⁺. La línea punteada expresa el efecto de la dopamina junto con el antagonista del receptor D2 i-sulpiride. La línea continua con puntos negros representa el efecto de la coadministración de dopamina y el antagonista del receptor D1 SCH-23390 a las concentraciones arriba indicadas. Los datos son el promedio de 8 determinaciones pertenecientes a 4 experimentos por separado, más o menos el error estándar.



Gráfica 4. Efecto del antagonista selectivo de receptores D1 SCH-23390 sobre la liberación de GABA inducido por alto potasio en la pars reticulata de ratas normales y en ratas denervadas. El fármaco se administró a la concentración señalada en forma de pulso desde la fracción 4 hasta la fracción 12. Los valores son el promedio de 4 a 8 determinaciones en por lo menos 2 experimentos \pm el error estándar.

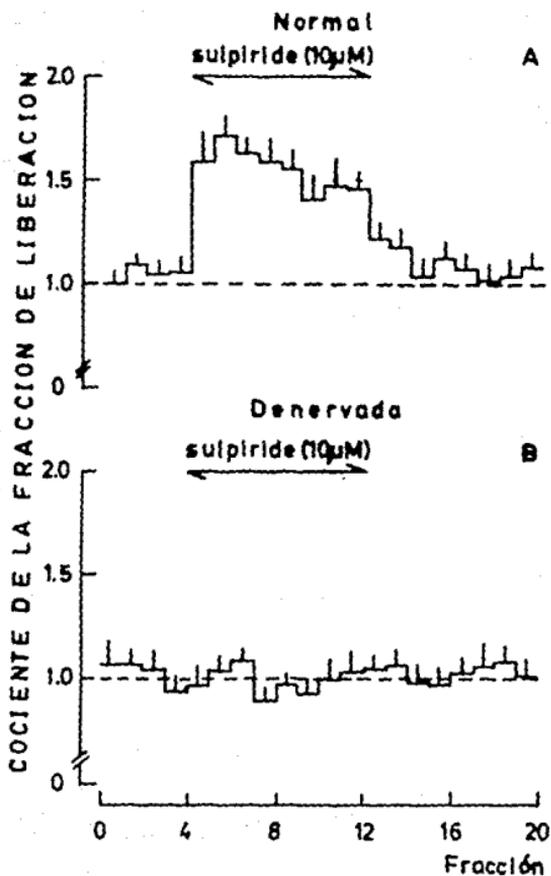
En la parte B (ratas denervadas) se muestra que el antagonista SCH-23390 aplicado a las rebanadas de ratas denervadas no tuvo ningún efecto sobre la liberación de GABA (C.F.L. = 0.98 ± 0.04 , $n=5$ sin significancia estadística).

4. Efecto de los antagonistas de receptores dopaminérgicos D₂ sobre la liberación de GABA inducido por potasio en rebanadas de pars reticulata de ratas normales y de ratas denervadas.

En la parte A de la gráfica 5 se muestra el bloqueo de los receptores D₂ en la pars reticulata de sustancia nigra de ratas normales, producido por el antagonista 1-sulpiride a una concentración de 10 μ M. Se nota una facilitación de la liberación de GABA de un 51% aproximadamente (C.F.L. = 1.55 ± 0.04 , $n=8$ $p < 0.001$). Al retirar la droga del medio de perfusión disminuyó esta liberación paulatinamente hacia su recuperación. En la parte B es claro que el 1-sulpiride no causó ningún efecto sobre la liberación de rebanadas de ratas denervadas (C.F.L. = 0.99 ± 0.02) a juzgar por la ausencia de cambios en la fracción de liberación.

- 5 Liberación Basal de GABA radiactivo en pars reticulata de ratas normales y denervadas.

La gráfica 6 muestra la liberación basal (espontánea) de GABA radiactivo inducido por alto potasio en rebanadas de SN de ratas normales y de SN denervadas. Se colectaron 20 fracciones de solución de 4 minutos cada una ($F=236.40$, $n=16$ para rata normal y $n=10$ para rata denervada, $p < 0.01$). Al comparar las



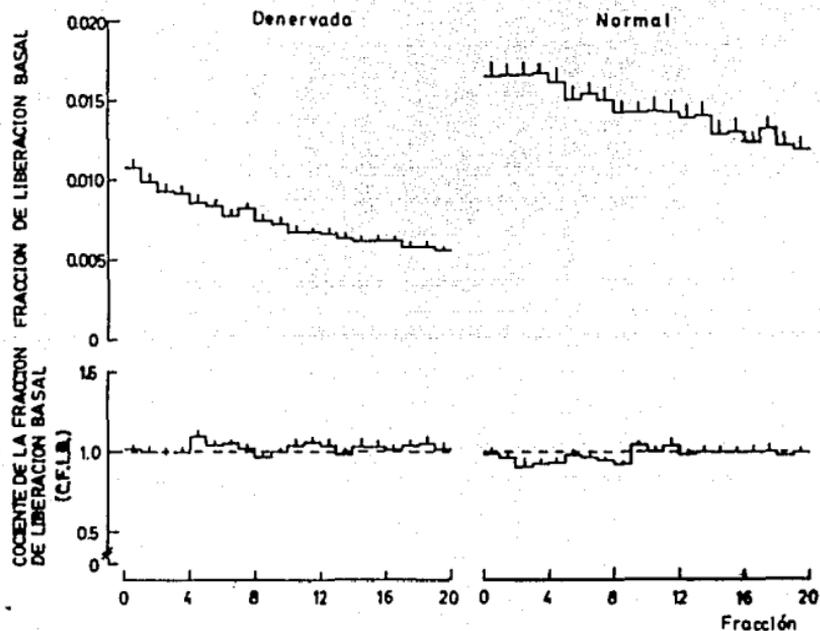
Gráfica 5. Efecto del antagonista dopaminérgico de receptores D₂ l-sulpiride sobre la liberación de GABA inducido por Kén la pars reticulata de ratas normales y de ratas denervadas. La droga se aplicó en la fracción 4 y se mantuvo hasta la fracción 12. Los datos son un promedio de 8 determinaciones de cuatro experimentos más o menos el error estándar.

liberaciones se puede ver que declinan lentamente conforme transcurre el tiempo y de forma significativamente mayor en SN de ratas normales, en todas las fracciones colectadas. En la parte inferior se observa al cociente de la fracción de la liberación (C.F.L. = 1.00 ± 0.02 , n=8 para reticulata de rata normal y 1.00 ± 0.02 , n=5 para reticulata de rata denervada) de pares de muestras oscilando alrededor de 1. Esto último nos indica que existe homogeneidad en la liberación basal de GABA radiactivo de las rebanadas de tejido de SN de ratas normales y de ratas denervadas.

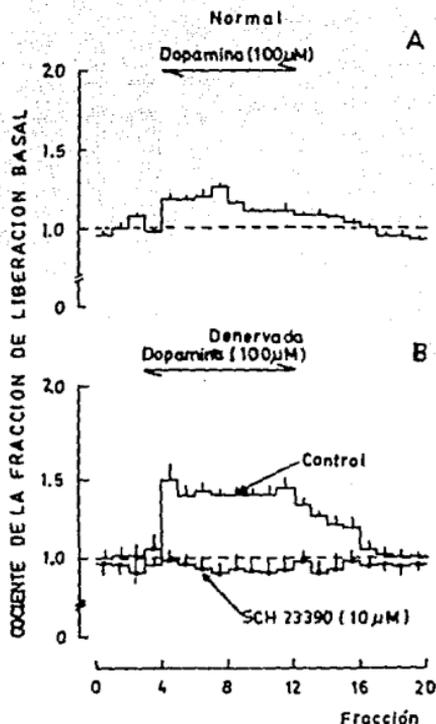
6. Efecto de la dopamina exógena sobre la liberación basal de GABA en la pars reticulata de ratas normales y de ratas denervadas.

En esta parte del trabajo se muestran resultados de la acción de la dopamina exógena sobre la liberación de GABA en rebanadas sin estímulo despolarizante, o sea sobre la liberación espontánea o basal.

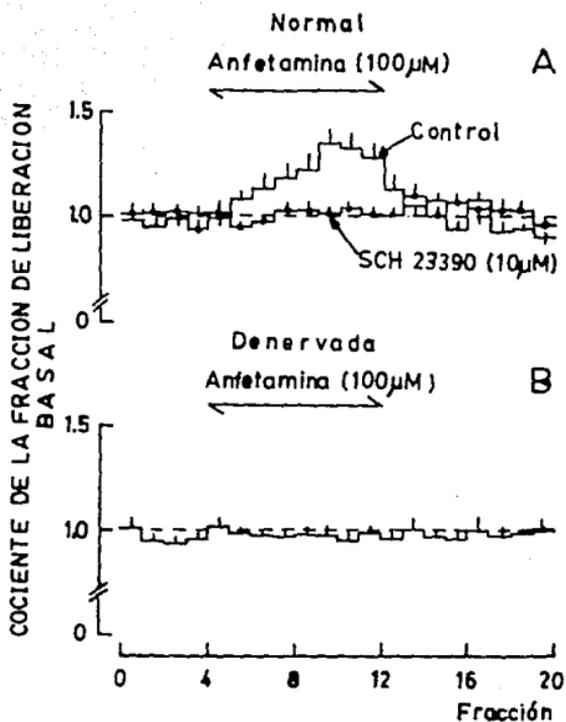
En la gráfica 7 se muestran resultados de una serie de experimentos en los que se observó el efecto de la aplicación de un pulso de dopamina exógena ($100 \mu\text{M}$) sobre la liberación espontánea de GABA en rebanadas de ratas normales, la cuál tuvo un incremento moderado (C.F.L.B. igual a 1.15 ± 0.02 , n=4 diferente del periodo control $p = 0.05$). En las rebanadas de SN denervadas se



Gráfica 6. Liberación basal de ^3H -GABA de rebanadas de la pars reticulata de ratas normales y de ratas denervadas. En la parte superior se muestra la liberación de ^3H -GABA como fracción de liberación basal (F.L.B.). En la parte inferior se muestra el cociente de la fracción de liberación de 8 pares de datos para rata normal y de 5 pares de datos para rata denervada. Los datos para los pares fueron tomados al azar de las gráficas superiores. Los valores son el promedio mas-menos el error estándar de 10 determinaciones para rata normal y de 10 determinaciones para rata denervada.



Gráfica 7. Efecto de la dopamina sobre la liberación basal de ^3H -GABA de rebanadas de la pars reticulata de sustancia nigra de ratas normales y de ratas denervadas. La droga se administró en forma de pulso a la dosis señalada en la figura. En la parte A se muestra el efecto de la dopamina sobre la liberación de GABA radiactivo en la pars reticulata de sustancia nigra de ratas normales. Los valores representados son el promedio de 6 determinaciones y su error (\pm la desviación estandar). En la figura B se muestra el efecto de la dopamina sobre la liberación de GABA en reticulata de ratas denervadas (línea continua). También se muestra el bloqueo del efecto de la dopamina por el antagonista selectivo de los receptores D_1 el SCH-23390 (línea discontinua). Estos resultados son el promedio de 4 determinaciones.



Gráfica 8. Efecto de la anfetamina sobre la liberación de GABA radiactivo, de rebanadas de reticulata de ratas normales y de ratas denervadas. En la figura A se muestra el resultado de la aplicación de anfetamina (100 μ M únicamente (línea continua) o en presencia de SCH-23390 (línea discontinua), sobre la liberación basal de GABA de ratas normales. En la figura B se observa el nulo efecto de la droga sobre la liberación de GABA en rebanadas de ratas denervadas con 6-Hidroxidopamina. Los valores son el promedio más-menos la desviación estándar de 8 determinaciones de cuatro experimentos.

observó un incremento de la liberación de GABA, de un 40% (C.F.L.B. = 1.42 ± 0.02 , $n=4$ $p=0.001$), este se mantuvo hasta que permaneció el pulso de dopamina y después disminuyó paulatinamente al eliminar la droga del medio de perfusión. Como se puede ver la estimulación fue bloqueada al aplicar SCH-23390 al medio de perfusión (C.F.L.B. = 0.93 ± 0.02 , $n=4$ $p=0.001$ estadísticamente diferente, pero no con respecto al control).

La dopamina exógena facilitó la liberación basal de GABA, la cual fue inhibida por SCH-23390. Una pregunta que surgió respecto a estos resultados es la de saber si la dopamina endógena liberada de las dendritas es capaz de facilitar la liberación de GABA.

7. Efecto de la anfetamina sobre la liberación basal de GABA radiactivo de rebanadas de pars reticulata de sustancia nigra de ratas normales y de ratas denervadas.

En la gráfica 8 se muestra la liberación espontánea de GABA en rebanadas de ratas normales (parte A) en las cuales la aplicación de anfetamina ($100 \mu\text{M}$) produjo una estimulación paulatina que alcanzó su máximo (30% aproximadamente) a los 16 minutos de su aplicación y que regresó a sus valores control cuando se eliminó la droga (C.F.L.B. = 1.29 ± 0.03 , $n=6$ $p=0.001$ con respecto del control). En presencia de SCH-23390 esta estimulación no se produjo (C.F.L.B. = 1.03 ± 0.03 , $n=4$ resultando estadísticamente diferente respecto del grupo tratado solamente con anfetamina). En la parte B se muestra que la anfetamina no tiene efecto sobre la liberación en rebanadas de SN denervadas (C.F.L.B. = 0.98 ± 0.01 $n=4$).

DISCUSION.

1. Justificación de la preparación.

Estudiar mecanismos de control presináptico en el sistema nervioso central es particularmente difícil, ya que se requiere medir la liberación de neurotransmisores en condiciones en que los cambios en la actividad somato-dendrítica no afecten durante el desarrollo experimental. Este requerimiento es llenado por preparaciones in vitro que contengan únicamente las terminales nerviosas como las rebanadas de cerebro y los sinaptosomas (Chesselet, 1984).

La rebanada de cerebro es una muestra de tejido o bloque fino en general de 300 μm de grosor que contiene las terminales nerviosas, cuerpos de las neuronas posinápticas y células gliales. Si esta se mantiene en un medio de incubación y de perfusión salino balanceado, suplementado con glucosa y oxígeno, se puede lograr preservar fisiológicamente activos los elementos que forman el bloque (Orrego, 1979).

Las rebanadas de cerebro utilizadas como técnica experimental tiene sus ventajas y sus desventajas que a continuación se mencionan.

Las ventajas son:

a) En las rebanadas hay una difusión fácil de agonistas y antagonistas, y por tanto se pueden conocer las concentraciones que pudieran alcanzar en el espacio sináptico.

b) Se evitan las barreras que impiden el paso de ciertas sustancias y su degradación en ciertas rutas metabólicas.

c) Es posible estudiar núcleos específicos del sistema nervioso central.

Estas tres ventajas nos permitieron estudiar muy específicamente el receptor presináptico D1 de la pars reticulata de la sustancia nigra de la rata y ser sujeto de manipulación farmacológica por medio de ciertas drogas, algunas de las cuales pueden ser fácilmente degradadas en tejidos periféricos como la dopamina.

Las desventajas son:

a) Algunas drogas pueden presentar dificultad en difundirse y alcanzar la concentración deseada en el espacio sináptico, si es medida en el medio de incubación o de perfusión.

b) La pérdida de aferencias del núcleo o región del núcleo estudiado pueden modificar la respuesta observada.

c) El daño que implica el corte y el cambio del medio extracelular in vivo al medio de incubación y al de perfusión.

Todo esto puede alterar la respuesta observada y posiblemente hacer la muestra no funcional.

La funcionalidad de las terminales nerviosas (objeto de estudio) contenidas en la preparación, fue evidente, ya que conservaron su capacidad de capturar, almacenar y liberar GABA como respuesta a un estímulo depolarizante dependiente del Ca^{++} extracelular, como se muestra en las gráficas 1 y 7.

Las drogas muestran una gran solubilidad y son fáciles de difundir en agua. Lo que aunado a la corta latencia observada a una respuesta dada nos hace suponer que las concentraciones alcanzadas de las drogas en el espacio sináptico son similares a las presentes en el medio de perfusión.

Es importante mencionar que la composición normal del medio de perfusión es muy similar al fluido extracelular y en el caso de la solución que contenía alto potasio se mantuvo el producto $[K^+][Cl^-]$ constante con respecto a la solución normal y la osmolaridad se compensó con sacarosa. Con lo que se evitó cambios osmóticos de tonicidad que pudieran afectar y dañar la preparación, alterando su respuesta.

El uso de rebanadas finas de 300 μm de grosor nos permitió una adecuada difusibilidad de nutrientes y de las drogas a todas las terminales nerviosas y cuerpos de las neuronas posinápticas. Y por otra parte la rebanada es lo suficientemente gruesa como para conservar buena parte de tejido no traumatizado por la disección, lo cual reduce mucho este factor (Cohen, 1974).

Se prefirió trabajar con rebanadas de cerebro ya que en estas se conserva la organización anatómico-funcional de la terminal GABAérgica y la neurona dopaminérgica. En cambio con sinaptosomas se pierde esta organización y por tanto el esclarecimiento del papel de la dopamina sobre la liberación de GABA en la pars reticulata encontrando dificultad en alcanzar los objetivos de este trabajo.

La dificultad en la medición de la liberación de GABA en las terminales nerviosas estriba en factores que dependen del sistema y de la metodología empleada, podemos mencionar los siguientes:

captura glial de GABA, metabolismo de la marca, homointercambio, captura y tipo de estimulación empleada. A continuación señalaremos como se minimizaron estos factores.

Se sabe que la glia interviene en el proceso de recaptura de GABA en esta región del cerebro y las terminales presinápticas (Henn y Hamberger, 1971); proceso mediante el cual las terminales incorporan, almacenan y liberan el neurotransmisor marcado radiactivamente durante la estimulación (Fagg y Lane, 1979). Las células gliales son capaces de liberarlo bajo determinadas condiciones (Orrego, 1978). Por otra parte el aminoácido β -alanina es un potente inhibidor de la captura glial de GABA pero no de la captura neuronal donde su potencia es menor (Johnston, 1977; Brennan y Cantrill, 1978). Para evitar el efecto de la captura glial de GABA radiactivo sobre la liberación de éste en las terminales presinápticas se realizó el marcaje radiactivo en presencia de β -alanina.

Una vez recapturado el GABA se metaboliza rápidamente por la enzima GABA-transaminasa (GABA-T) en un proceso dinámico de síntesis-almacen-liberación-recaptura-metabolismo (Sellstrom, et al., 1975; Bernarthy y Zigmond, 1988). Debido a esto es necesario asegurarse que la marca radiactiva corresponda a GABA y no a uno de sus metabolitos y este efecto se minimiza usando un inhibidor de la enzima GABA-T que es el ácido amino-oxi-acético al agregarse a los medios de incubación y de perfusión. Además este ácido es un pobre inhibidor de la captura y liberación de GABA (Snodgrass e Iversen, 1973).

El sistema de captura que sirve para el marcaje de las terminales nerviosas puede activarse al ser estimuladas con alto

potasio y modificar la medición de la liberación de GABA radiactivo. El bloqueo de la recaptura de GABA se puede realizar si se usa ácido nipecótico que es un inhibidor no competitivo. Droga que no inhibe a las demás enzimas que intervienen en el metabolismo de GABA (Johnston, et al., 1978).

Como se mencionó anteriormente hay tres maneras de inducir la liberación de un neurotransmisor (eléctrica, alto potasio y por veratridina). Aun cuando la estimulación eléctrica es la técnica más usada presenta serias dificultades que surgen de mantener la estimulación por un tiempo prolongado lo cual conlleva a una polarización de los electrodos y a la formación de electrólitos citotóxicos que pueden provocar muerte celular (Orrego, 1979). En cambio con la estimulación con alto potasio se puede mantener durante un periodo prolongado sin dañar la preparación (Frankhuysen y Mulder, 1982). La concentración que usamos de potasio se encuentra dentro de la máxima concentración aceptable fisiológicamente por el sistema (Sykova, 1980). Las concentraciones arriba de la usada en nuestro sistema experimental pueden provocar daño, ya que no mantienen la tonicidad del medio y pueden provocar también la movilización de GABA de compartimientos citoplasmáticos y gliales que se marcaron radiactivamente (Fagg y Lane, 1979). La tonicidad del medio se conservó al mantener el producto $[K^+][Cl^-]$ constante.

2.- Liberación basal vs liberación inducida por alto potasio.

Los resultados de las gráficas 1 y 6 muestran las condiciones de la respuesta espontánea y de liberación con alto potasio en rebanadas de sustancia nigra. Aunque los datos son cocientes relativos, cabe destacar 2 hechos. Primero existe una diferencia clara en la liberación basal en rebanadas de SN pars reticulata de ratas normales en relación a las ratas denervadas. Las rebanadas de cerebro provenientes de ratas normales liberan aparentemente más GABA que las denervadas probablemente por una influencia tónica estimulatoria de la dopamina que se evidencia durante la denervación. Segundo la liberación inducida por K^+ es similar en ambos casos, pero debido a que el procesamiento de datos implica restar la liberación basal los cambios debidos a la ausencia de dopamina no son evidentes. Además durante la liberación basal puede en estas condiciones representar una liberación de sitios no específicos (Orrego, 1979). En tanto que la inducida altamente dependiente de calcio representa la liberación de GABA del pool vesicular. Por otra parte la liberación muestra a muestra fue homogénea en general en todas las cámaras, ya que el cociente de la fracción de la liberación osciló alrededor de uno, tanto para muestras expuestas a potasio como aquellas que no se expusieron a K^+ y con o sin denervación. Esto nos indica que las condiciones experimentales fueron las mismas para todas las muestras, aún las que recibieron estimulación, lo que permitió establecer al azar los grupos control y experimental.

Si nos fijamos únicamente en los resultados de la gráfica 6 encontramos una diferencia en las liberaciones para rebanadas de

SNR normales y denervadas. En rebanadas de SNR de ratas normales hay una mayor liberación que en rebanadas de SNR de ratas denervadas. Esto se debe a que en ratas normales existen dendritas dopaminérgicas funcionales y debido al fenómeno de homointercambio hay dopamina en el medio, la cual puede activar los receptores presinápticos D_1 presentes en las terminales GABAérgicas estimulándolos para producir una facilitación de la liberación de GABA. Resulta difícil pensar que la dopamina genere este tipo de respuesta o sea que la dopamina modula la liberación de GABA a través de los receptores D_1 presinápticos y de aquí es más difícil decidir el papel que juega en la pars reticulata y por ende en la sustancia nigra.

3.- Dopamina endógena vs dopamina exógena.

La dopamina exógena parece no modificar la liberación de GABA en ratas normales (ver. gráfica 2) y por lo tanto resulta difícil deducir el papel de la dopamina en la pars reticulata de la sustancia nigra de la rata, aun cuando se conoce la existencia de receptores D1, sin embargo se puede establecer que la dopamina exógena y la endógena estimulan la liberación de GABA en base a los datos experimentales que a continuación se mencionan.

La dopamina exógena a la concentración usada (1 μ M no modificó la liberación de GABA producida con K en rata normal (ver lado A de la gráfica 2). Esto podría ser resultado de que no sólo se libere GABA sino también se libere dopamina endógena de las neuronas dopaminérgicas que proyectan a la pars reticulata, lo cual posiblemente enmascare el efecto de la dopamina exógena, como lo sugiere el efecto de la dopamina en ratas denervadas (Arbilla, et al., 1981). Tomando en cuenta que en condiciones de no depolarización no hay dopamina en el sistema y que la dopamina exógena puede activar los receptores dopaminérgicos se puede entender que la dopamina exógena (100 μ M facilite una pobre liberación de GABA en rata normal (ver gráfica 7). En cambio en rebanadas de SN denervadas, la liberación de GABA es apreciablemente mayor y puede ser bloqueada por la aplicación de SCH-23390 (10 μ M como se observa en la parte inferior de la gráfica 7. Tal efecto facilitador se puede explicar si se considera que se activan receptores D1 y por añadidura se presenta el fenómeno de supersensibilidad de receptores como en casos de lesión (Ungersted, 1971a). Dichos fenómenos incrementan grandemente la liberación de GABA de las terminales nerviosas

GABAérgicas como también se puede observar en el lado B de la gráfica 2, en el que inmediatamente después de la aplicación de dopamina exógena se ve un gran incremento en la liberación de GABA el cual se mantuvo a lo largo de la aplicación del pulso de dopamina exógena.

El estudio del efecto de la dopamina sobre la liberación de GABA se ha llevado a cabo usando antagonistas y agonistas como el haloperidol y la apomorfina que son drogas que desactivan o activan a los dos tipos de receptores (Stoof y Keabian, 1982). Pero por su inespecificidad no se usaron en el presente trabajo, aun cuando se ha encontrado que la apomorfina inhibe la liberación de GABA por la dopamina endógena (Arbilla et al., 1981).

Los resultados de las gráficas 3, 4, 5 y 7 nos indican que la facilitación de la liberación de la dopamina en rata denervada fue bloqueada por la adición del antagonista selectivo de los receptores D1 SCH-23390 y el antagonista de los receptores D2 sulpíride no tuvo ningún efecto sobre la liberación de GABA. Lo cual se puede explicar por la existencia y funcionalidad de los receptores D1 en la pars reticulata de rata denervada los cuales al ser activados por la dopamina endógena facilitaron la liberación de GABA y el bloqueo de aquellos por SCH-23390 produjo una inhibición de esta. Se puede mencionar de paso que todo esto nos indica la ausencia de receptores D2 modulando la liberación de GABA.

En rebanadas de ratas normales y denervadas se estudió el efecto de los receptores D2 sobre la liberación de GABA, ya que se sabe que se localizan en el soma y en las dendritas de las neuronas dopaminérgicas y se les asocia con el control en el

disparo neuronal (Agnajanian y Bunney, 1977). Y que al ser activados podrían inhibir la liberación de dopamina endógena, la cual modificaría de una manera análoga la liberación de GABA, la que estaría modulada por los receptores D1 presentes en las terminales de la vía estriato-nigral. Aquí radica la supuesta explicación del efecto de sulpiride (ver gráfica 5) que incrementó la liberación de GABA en ratas normales. Lo cual se debe a que bloqueó los receptores D2, conduciendo por tanto a una mayor liberación de dopamina y ésta a su vez produjo una estimulación de los receptores D1, generando una mayor salida de GABA. Los resultados del lado A de la gráfica 5 apoyan la suposición antes dicha ya que no se observó incremento o modificación alguna en la liberación de GABA de la SNP de rata denervada por efecto de añadir sulpiride al medio de perfusión en el tiempo y a la concentración que se señala en la parte correspondiente de la gráfica 5.

Por el contrario, de la gráfica 4 se puede mostrar la evidente influencia característica de la droga SCH-23390 sobre los receptores D1, es decir aquí se encontró el efecto inhibitorio de la droga o bloqueo de la acción de la dopamina endógena (parte A). Para su corroboración podemos mencionar que SCH-23390 no modificó la liberación de GABA, como se muestra en los resultado de la parte B de la gráfica 4. Esto es posible si suponemos que debido a la eliminación de las dendritas dopaminérgicas de la pars reticulata no hay liberación de dopamina endógena y por tanto no se observa ningún efecto al añadir el antagonista de los receptores D1 sobre la liberación de GABA.

La anfetamina, que es una droga que moviliza dopamina de

compartimientos intracelulares, produjo un aumento en la liberación de GABA en rebanadas de SNR de ratas normales, efecto que fue bloqueado por la droga SCH-23390 (ver gráfica 8). Para explicar dicho efecto pensamos que la dopamina movilizada estimuló receptores D1 facilitando la liberación de GABA. Los resultados de la misma gráfica pero para ratas denervadas refuerzan al hecho de la modulación de la liberación de GABA por la dopamina, si se tiene en cuenta que con la eliminación de las dendritas dopaminérgicas del sistema se elimina la fuente de dopamina endógena posible de movilizar, y por lo que en ratas denervadas no se encontró ningún efecto de la aplicación de la anfetamina.

El mecanismo subyacente mediante el cual el receptor D1 facilita la liberación del neurotransmisor permanece todavía sin esclarecer aun cuando se sabe que la estimulación de los receptores D1 aumentan la actividad de la adenilato ciclasa en la sustancia nigra y la formación de AMP cíclico el cual es posible que esté involucrado en la fosforilación de proteínas asociadas a las vesículas sinápticas, en forma particular la sinapsina y la proteína III, esta fosforilación es quizás la responsable de la liberación facilitada (Walaas et al., 1989).

Por otro lado algunos estudios han encontrado que la L-dopa que es un agente antiparkinsoniano facilita la liberación de GABA en la sustancia nigra por activación de receptores D1 y estimula a la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en los ganglios basales de los pacientes con mal de Parkinson (Lloyd y Hornykiewicz, 1976; Weick, et al., 1990), lo cual sugiere que la activación de los receptores D1 está involucrada en la síntesis de GABA, afectando la síntesis de la enzima limitante que es la GAD.

Queda esto por resolver ya que no está claro el papel de los receptores D1 en el control de la síntesis de GABA.

De los receptores para la dopamina, los autorreceptores son más sensibles a los agonistas que los receptores posinápticos (Skirboll, 1979). La desensibilización es un fenómeno que se presenta por exposición prolongada del receptor al agonista (Goth, 1984); en el caso de los receptores dopaminérgicos D1 no se presentó este fenómeno durante los 32 minutos de exposición.

La funcionalidad de los receptores D1 en la sustancia nigra radica en que la activación de estos conduce a una liberación de GABA en la pars reticulata de la sustancia nigra. El sistema dopaminérgico nigroestriatal produce o ejerce control sobre el sistema GABAérgico estriatonigral a dos niveles que son el soma donde la dopamina activa a las neuronas GABAérgicas en el estriado y el presináptico donde estimula la liberación de GABA. Por otra parte los receptores D1 participan en la generación de conductas estereotipadas en las que están involucradas deficiencias en el sistema dopaminérgicos donde la coactivación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 provocan una respuesta potenciada evaluada conductualmente conocida como conducta estereotipada que incluye acicalamiento, hiperactividad, conducta exploratoria, etc. Si se administran solamente agonistas para receptores D2 la respuesta observada es de un incremento de la actividad motora pero no presenta estereotipias, como sucede con la administración de agonistas D1. Ahora bien si se administran ambos agonistas se produce un patrón análogo como el que se presenta con la aplicación de apomorfina. Aun cuando se ha observado que la administración de agonistas D2 genera un patrón parecido a la

estereotipia, este es fuertemente potenciado si se aplican también agonistas D1. Los antagonistas de los receptores D1 como el SCH-23390 aumentan la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Mereu, et. al., 1986). La explicación se da porque el SCH-23390 bloquea los receptores D1 de las terminales GABAérgicas disminuyendo con esto la liberación de GABA lo que equivaldría a un aumento de la actividad de las neuronas dopaminérgicas. Aunque se sabe que la apomorfina inhibe la actividad de las neuronas GABAérgicas de la pars reticulata denervada con 6-hidroxidopamina (Weick y Walters, 1987). Lo anterior lo podemos resumir diciendo que los receptores D1 mimetizan la acción de la apomorfina, pero no los receptores D2 o con otras palabras la apomorfina activa preferencialmente los receptores D1, generando un aumento de la liberación de GABA. Este último efecto se produce como resultado de la acción de los agonistas de los receptores D1 y lo cual no se tiene con los receptores D2.

La acción de la dopamina a los dos niveles mencionados anteriormente implica un doble control en el cual se refuerza la acción de la dopamina en el estriado al ser activados los receptores D1 en la sustancia nigra o sea que se asegura el paso de la información a través de los sistemas GABAérgicos: estriado nigral, por lo que los receptores D1 pueden resultar muy importantes (Roberston y Roberston, 1987).

Según los resultados de este trabajo es probable que en otros sistemas similares a los que se encuentran en la pars reticulata (de origen estriatal como el núcleo entopeduncular) los receptores D1 controlen la liberación de GABA ejerciendo un segundo control análogo al que se encuentra en la sustancia nigra.

CONCLUSIONES.

1.- La liberación de GABA en la pars reticulata de la sustancia nigra está modulada de una manera directa por los receptores D1 presentes en las terminales GABAérgicas.

2. Modulación indirecta de la liberación GABA a través de los autorreceptores D2 que regulan la liberación de dopamina de las dendritas de las neuronas dopaminérgicas.

3. La dopamina endógena liberada de las dendritas es capaz de modular la liberación de GABA a través de estos receptores.

BIBLIOGRAFIA.

- Aceves, J. and Cuello, A.C. Dopamine release induced by electrical stimulation of microdissected caudate-putamen and substantia nigra of the rat brain. *Neuroscience* . 6 (10) : 2069-2075. 1981.
- Aghajanian, G.K. and Bunney, B.S. Dopamine "Autoreceptors" : Pharmacological characterization by microiontophoretic single cell recording studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 297 : 1-17. 1977.
- Also, M. Shigematsu, K. Keabian, J.W., Potter, W.Z., Cruciani, R.A., and Saavedra, J.M. Dopamine D1 receptor in rat brain: a quantitative autoradiographic study with ¹²⁵I-SCH 23982. *Brain Res.* 408 : 281-285. 1987.
- Akaike, A., Yukihiro, O., Masashi, J.W., and Takaori, T. Excitatory and inhibitory effects of dopamine on neuronal activity of the caudate nucleus neurons in vitro . *Brain Res.* 418 : 262-272. 1987.
- Andén, N.E., Fuxe, K., Hamberger, B., and Hökfelt, T. A quantitative study on the nigro-striatal dopamine neuron system in the rat. *Acta Physiol. Scand.* 67 : 308-312. 1968.
- Andén, N.E., Carlsson, A., Dahlström, A., Fuxe, K., Hillarp, N.A., and Larson, K. Demonstration and mapping out of nigro-striatal dopamine neurons. *Life Sci.* 3: 523-530. 1984.
- Arbilla, S., Kamal, L., and Langer, S.Z. Inhibition by apomorphine of the potassium-evoked release of [³H]- γ -aminobutyric acid from the rat substantia nigra. in vitro. *J. Pharmacol.* 74 : 389-397. 1981.
- Arnt, J. and Hyttel, J. differential inhibition by dopamine D1 and D2 antagonist of circling behavior induced by dopamine agonist in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Eur. J. Pharmacol.* 102 : 349-354. 1984.
- Attie, M.F., Brown, E.M., Gardner, D.G., Spiegel, A.M. and Aurbach, G.D. Characterization of the dopamine-responsive adenylate cyclase of bovine parathyroid cells and its relationship to parathyroid hormone secretion. *Endocrinology.* 107 : 1776-1781. 1980.
- Barone, P., Tucci, I., Parashos, S.A., and Chase, T.N. D-1 dopamine receptor changes after striatal quinolinic acid lesion. *Eur. J. Pharmacol.* 138 : 141-145. 1987.
- Beckstead, R.M. Association of dopamine D1 and D2 receptors with specific cellular elements in the basal ganglia of the cat: the uneven topography of dopamine receptors in the striatum is determined by intrinsic striatal cells, not nigrostriatal axons. *Neuroscience.* 1988 .

- Beckstead, R.M., Domesick, V.B., and Nauta, W.J.H. Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res.* 175 : 191-217. 1979.
- Beninato, M., and Spencer, R.F. A cholinergic projection to the substantia nigra: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Exp. Brain Res.* 72: 178-184. 1988.
- Bentivoglio, M., Kooy, D. van der., y Kuypers, H.G.J.M. The organization of the efferent projections of the substantia nigra in the rat. *Brain Res.* 174 : 1-17. 1979.
- Bernath, S. and Zigmond, M.J. Characterization of [H]GABA release from striatal slices: Evidences for a calcium independent process via the GABA uptake system. *Neuroscience.* 27 : 563-570. 1988.
- Bjorklund, A. and Lindvall, O. Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons suggestions for a role dendritic terminals. *Brain Res.* 83 : 531. 1975.
- Blum, J.W., Kunz, P., Fischer, J.A., Binswanger, U., Lichtensteiger, W. and Daprada, M. Parathyroid hormone response to dopamine in cattle. *Am. J. Physiol.* 239 : E255-264. 1980.
- Bodis-Wollner, I. Visual deficits related to dopamine deficiency in experimental animals and Parkinson's disease patients. *Tins.* 13(7). 296-300. 1990.
- Brennan, M.J. and Cantrill, R.C. The effect of GABA and β -alanine on the efflux of [H] GABA from preloaded rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 31 : 1339-1341. 1978.
- Brown J.H. and Makman, M. Stimulation by dopamine of adenylate cyclase in retinal homogenates and adenosine-3':5'-cyclic monophosphate formation in intact retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 69 : 539-543. 1972.
- Brown, E.M., Carroll, R.J. and Aurbach, G.D. Dopaminergic stimulation of cyclic AMP accumulation and parathyroid hormone release form dispersed bovine parathyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 : 4210-4213. 1977.
- Bunney, B.S., Walters, J.R., Roth, R.H., and Aghajanian, G.K. J. Dopaminergic neurons: Effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. *Pharmacol. Exp. Ther.* 185 : 580-571. 1973.
- Bunney, B.S. and Aghajanian, G.K. The precise localization of nigral afferents in the rat as determined by retrograde tracing technique. *Brain Res.* 117: 423-435. 1978.
- Carpenter, M.B., Batton, R.R., Carleton, S.C., and Keller, J.T. Interconnections and organization of pallidal and subthalamic nucleus neurons in the monkey. *J. Comp. Neurol.* 197: 579-603. 1981.

- Carpenter, M.B., Carleton, S.C., Keller, J.T., and Conte, P. Connections of the subthalamic nucleus in the monkey. *Brain Res.* 224: 1, 1981a.
- Carpenter, M.B. Interconnections between the corpus striatum and brain stem. *Advances in behavioral biology. The basal ganglia.* Edited by J. McKenzie, R.E. Kermm, L.N. Wilcock. Plenum Press. 27: 1-67. 1984.
- Carpenter, M.B. and Peter, P. Nigrostriatal and nigrothalamic projections in the monkey demonstrated by autoradiographic technics. *J. Comp.* 144 : 93. 1972.
- Clement-Cormier, Y.C., Kebebian, J.W., Petzold, G.L., and Greengard, P. Dopamine-sensitive adenylate cyclase in mammalian brain: A possible site of action of antipsychotic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 71 : 113-1117. 1974.
- Cohen, S.R. The dependence of water content and "extracellular" marker spaces of incubated mouse brain slices on thickness, alterations produced by slicing and fluid spaces in intact and altered tissue. *Exp. Brain Res.* 64: 435. 1974.
- Compton, D.P. and Johnson, K.M. Striatal synaptosomal dopamine synthesis: evidence against direct regulation by an autoreceptor mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 110 : 157-162 . 1985.
- Connor, J.D. Caudate nucleus neurons: correlation of the effects of substantia nigra stimulation with iontophoretic dopamine. *J. Physiol. (Lond.)* 208-703 : 691. 1970.
- Cools, A.R. and Van Rossum, J.M. Multiple receptors for brain dopamine in behavior regulation: concept of dopamine-E and dopamine-I receptors. *Life Sci.* 27 : 1237-1253. 1980.
- Cote, T.E., Eskay, R.L., Frey, E.A., Grewe, C.W., Munemura, M., Sloof, J.C. and Suruta, K. Biochemical and physiological studies of the beta-adrenoceptor and the D-2 dopamine receptor in the intermedial lobe of the rat pituitary gland: A review. *Neuroendocrinology.* 35 : 217-224. 1982.
- Chang, H.T., Kita, H., y Kitai, S.T. The ultrastructural morphology of the subthalamic-nigral axon terminals intracellularly labeled with horseradish peroxidase. *Brain Res.* 299 : 182-185. 1984.
- Chesselet, M.-F. Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: Facts and hypothesis. *Neuroscience.* 12(2): 347-375. 1984.
- Dahlström, A. and Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system-I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 62(232): 1-55. 1965.

- DeLong, M.R. Primates models of movements disorders of basal ganglia origin. *TINS*. 13(7). 281-285. 1990.
- Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S., and Beaudet, A. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: A light and electron microscope radioautographic study. *J. Comp. Neurol.* 27: 339-345. 1982.
- DiChiara, G., Porceddu, M.L., Morelli, M., Mulas, M.L. and Gessa, G.L. Evidence for a GABAergic projection from substantia nigra to ventromedial thalamus. *Brain Res.* 176: 273-284. 1979.
- Difiglia, M., Aronin, N., and Martin, J.B. Light and electron microscopic localization of immunoreactive Leu-enkephalin in the monkey basal ganglia. *J. Neurosci.* 2: 303. 1982.
- Dray, A., Gonye, T.J., Oakley, N.R., y Tanner, T. Evidence for the existence of a raphe projection to the substantia nigra in rat. *Brain Res.* 113: 45-57. 1976.
- Dray, A. The Physiology and pharmacology of mammalian basal ganglia. *Progg. Neurobiol.* 14: 221-235. 1980.
- Duffy, M.J., Mulhall, D. and Powell, D. Subcellular distribution of substance P in bovine hypothalamus and substantia nigra. *J. Neurochem.* 25 : 305-307. 1975.
- Dunnett, S.B. and Iversen, S.D. Learning impairments following selective kainic acid-induced lesions within the neostriatum of rats. *Behav. Brain Res.* 2: 189-209. 1981.
- Euvrard, C., Ferland, L., Dipaolo, T., Beaulieu, M., Labrie, F., Oberlander, C., Raynaud, J.P. and Boissier, J.R. Activity of two new potent dopaminergic agonist at the striatal and anterior pituitary levels. *Neuropharmacology.* 19: 379-386. 1980.
- Fagg, G.E. and Lane, J.D. The uptake and release of putative amino acid neurotransmitters. *Neuroscience.* 4: 1015-1036. 1979.
- Filloux, F.M., Wamsley, J.K., and Dawson, T.M. Presynaptic and postsynaptic D1 dopamine receptors in the nigrostriatal system of rat brain: a quantitative autoradiographic study using the selective D1 antagonist [H]SCH 23390. *Brain Res.* 408: 205-209. 1987.
- Fog, R. On stereotypy and catalepsy: Studies on the effect of amphetamine and neuroleptics in rats. *Acta Neurol. Scand.* 48 : Suppl. 50: 11-18. 1972.
- Fonnum, F. and Walberg, F. The concentration of GABA within inhibitory nerve terminals. *Brain Res.* 62: 577-579. 1973.
- Geffen, L.B., Jessell, T.M., Cuello, A.C., and Iversen, L.L. Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Nature. 260: 258-260. 1976.

- Gershanik, O., Heikkila, R.E. and Duvoisin, R.C. Effects of dopamine depletion on rotational behavior to dopamine agonists. *Brain Res.* 261 : 358-360 . 1983.
- Goldstein, M., Anagnoste, N. y Shirron, C. The effect of trivastal, Haloperidol and dibutyryl AMP on CC dopamine synthesis in rat striatum. *J. Pharm. Pharm.* 25: 348-351. 1973.
- Gonzalez-Vegas, J.A. Antagonism of dopamine-mediated inhibition in the nigrostriatal pathway: a mode action some catatonia-inducing drugs. *Brain Res.* 80: 219-228. 1974.
- Goth, A. *Farmacologia Médica: principios y conceptos.* Ediciones Doyma. Barcelona, España. 10. 1984.
- Gower, A.J. and Marriott, A.S. Pharmacological evidence for the subclassification of central dopamine receptors in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 77 : 185-194 .1982.
- Graybiel, A. M. Organization of the nigrostriatal connection: An experimental tracer study in the cat. *Brain Res.* 143: 339-348. 1978.
- Grewe, C.W., Frey, E.A., Cole, T.E. and Keabian, J.W. YM-09151-2: a potent antagonist for a peripheral D2-dopamine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 81 . 149-152 . 1982 .
- Grofová, I., Ottersen, O.P., and Rinvik, E. Mesencephalic and diencephalic afferents to the superior colliculus and periaqueductal gray substance demonstrated by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in the cat. *Brain Res.* 146: 205. 1978.
- Grofová, I. and Rinvik. An experimental electron microscopic study on the striatonigral projection in the cat. *Brain Res.* 11 : 249-262. 1970.
- Grofová, I. The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 91: 286-291. 1975.
- Groves, P.M. A theory of functional organization of the neostriatum and the neostriatal control of voluntary movement. *Brain Res. Rev.* 5: 109 .1983.
- Guyenet, P.G. and Aghajanian, G.K. Antidromic identification of dopaminergic and other output neurons of rat substantia nigra. *Brain Res.* 150: 69-84. 1978.
- Hattori, T., Fibiger, H.C. y McGeer, P.L. Demonstration of a pallido-nigral projection innervating dopaminergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 162: 487-504 .1978.

- Hattori, T., McGeer, P.L., Fibiger, H.C., y McGeer, E.G. On the source of GABA-containing terminals in the substantia nigra. Electron microscopic, autoradiographic and biochemical studies. *Brain Res.* 54: 103-114. 1973.
- Hattori, T., McGeer, P.L., and McGeer, E.G. Dendro axonic neurotransmission. II. Morphological sites for the synthesis binding and release of neurotransmitters in dopaminergic dendrites in the substantia nigra and cholinergic dendrites in the neostriatum. *Brain Res.* 170: 71-83. 1979.
- Hemmings, H. C., Greengard, P., Lim Tung, H. Y. and Cohen, P. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature.* 310: 503-505. 1984.
- Henn, F.A., and Hamberger, A.A. A glial cell function: Uptake of transmitter substances. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68: 2682. 1971.
- Hikosaka, C. and Wurtz, R.H. Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata. I. Relation of visual and auditory responses related to saccades. *J. Neurophysiol.* 49: 1230-1253. 1983.
- Hikosaka, C. and Wurtz, R.H. Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata. II. Visual responses related to fixation of gaze. *J. Neurophysiol.* 49: 1254-1267. 1983.
- Hikosaka, C. and Wurtz, R.H. Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata. III. Memory-contingent visual and saccades. *Neurophysiol.* 49: 1268. 1983.
- Horn, A.S., Tepper, P., Keibarian, J.W., and Beart, P.M. N-0434, a very specific new D-2 dopamine receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* 99: 125-126. 1984.
- Hornykiewicz, O. Psychopharmacological implications of dopamine and dopamine antagonist: A critical evaluation of current evidence. *Neuroscience.* 3: 773-783. 1978.
- Hyttel, J. SCH 23390 the first selective dopamine D-1 antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 91: 153-154. 1983.
- Iorio, L.C., Barnett, A., Leitz, F.H., Houser, V.P., and Korduba, C.A. SCH 23390, a potential benzazepine anti-psychotic with unique interactions on dopaminergic systems. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226: 462-468. 1983.
- Iversen, L.L. Dopamine receptors in the brain. *Science.* 188: 1084-1089. 1975.
- Iversen, L.L., Rogansky, M. and Miller, R. Comparison of the effects of drug on pre- and postsynaptic dopaminergic

- mechanisms in the rat striatum. *J. Mol. Pharmacol.* 12: 251-262. 1976.
- Johnston, G.A.R. Effects of calcium on the potassium-stimulated release of radioactive β -alanine and γ -aminobutyric acid from slices of rat cerebral cortex and spinal cord. *Brain Res.* 121: 179-181. 1977.
- Johnston, G.A.R., Krogsgaard-Larsen, P., Stephanson, A.L., and Twitchin, B. Inhibition of the uptake of GABA and related amino acids in the rat brain slices by optical isomers of nipecotic. *J. Neurochem.* 28: 1026-1032. 1976.
- Kamal, L.A., Arbilla, S. and Langer, S.Z. Presynaptic modulation of the release of dopamine from the rabbit caudate nucleus: differences between electrical stimulation amphetamine and tyramine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218, 592-598. 1981.
- Kanazawa, I., Marshall, G.R. and Kelly, J.S. Afferents to the rat substantia nigra studied with horseyadish peroxidase with special reference to fibers from the subthalamic nucleus. *Brain Res.* 115: 485-491. 1976.
- Kats, B. and Milide, R. Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringers. *J. Physiol. Lond.* 203: 689-706. 1989.
- Kebabian, J.W. and Greengard, P. Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: Possible role in synaptic transmission. *Science.* 174: 1348-1349. 1971.
- Kebabian, J.W., Petzold, G.L., and Greengard, P. Dopamine-sensitive adenylyl cyclase in caudate nucleus of rat brain and its similarity to the "dopamine receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 69: 2145-2149. 1972.
- Kebabian, J.W. and Calne, D.B. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93-96. 1979.
- Kebabian, J.W., Agui, T., van Oene, J.C., Shigematsu, K., and Saavedra, J.M. The D1 dopamine receptor: new perspectives. *TIPS Reviews.* 96-99. 1986.
- Kelly, E., and Nahorsky, S.R. Specific inhibition of dopamine D-1 mediated cyclic AMP formation by dopamine D-2, muscarinic cholinergic, and opiate receptor stimulation in rat striatal slices. *J. Neurochem.* 47: 1512-1517. 1986.
- Kelly, E., and Nahorsky, S.R. Endogenous dopamine functionally activates D-1 and D-2 receptors in striatum. *J. Neurochem.* 49(1): 115-120. 1987.
- Kemp, J.M. The termination of strio-pallidal and strio-nigral fibers. *Brain Res.* 17: 125-128. 1970.

- Kitai, S.T. Excitatory nature of dopamine in the nigro-striatal pathway. *Exp. Brain Res.* 24: 351-363. 1976.
- Kitai, S.T., and Kita, H. Anatomy and physiology of the subthalamic nucleus: a driving force of the basal ganglia. *THE GANGLIA BASAL*. Ed. por M.B. Carpenter and A. Jarayama. Plenum Press. 1987.
- Kitai, S.T., Kocsis, J.D., and Wood, J. Origen and characteristics of the cortico-caudate afferents : An anatomical and electrophysiological study. *Brain Res.* 118: 137. 1976.
- Kohli, J.D. and Goldberg, L.I. Effects of 3',4'-dihydroxynomefensine on the dopamine vascular receptors. *J. Phamar. Pharmacol.* 32: 225-226. 1980.
- König, J.F.R. and Klippel, R.A. *The Rat Brain: A Stereotaxic Atlas*. R.E. Krieger, Huntington, N.Y. 1970 .
- Kozlowski, M.R. and Marshall, J.F. Plasticity of [C12]-deoxy-D-glucosa incorporation into the neostriatum and related structures in response to dopamine neuron damage and apomorphine replacement. *Brain Res.* 197: 167-183. 1980.
- Krogsgaard-Larsen, P. and Johnston, G.A.R. Inhibition of GABA uptake in rat brain slices by nipecotic acid, various isoxasoles and related compounds. *J. Neurochem.* 25: 797-802. 1975.
- Kuhar, M.J., Aghajanian, G.K., and Roth, R.H. Tryptophan hydroxylase activity and synaptosomal uptake of serotonin in discrete brain regions after midbrain raphe lesions: correlations with serotonin levels and histochemical fluorescence. *Brain Res.* 44: 185. 1972.
- Kultas-Ilinsky, K., Ilinsky, I., Warton, S., and Smith, K.R. Fine struture of nigral and pallidal afferents in the thalamus: An EM autoradiographic study in the cat. *J. Comp. Neurol.* 216 : 390. 1983.
- Langer, S.Z. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmac. Rev.* 32: 337-362. 1981.
- Lehman, J. and Langer, S.Z. The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopamine terminals?. *Neuroscience.* 10(4) : 1105-1120. 1983.
- Lloyd, H.J. and Hornykiewics, O. L-glutamic acid descarboxilase in Parkinson's disease: effects of L-dopa - therapy. *Nature.* 243: 521-523. 1973.
- Mereu, G., Collu, M., Ongini, E., Biggio, G., and Gessa, G.L. SCH-23390 selective dopamine D1 antagonist activates dopamine neurons but fails to prevent their inhibition by apomorphine . *Eur J. Pharmacol.* 111: 393-396 . 1985 .

- Mir, A.K., McQueen, D.S., Pallot, D.J. and Nahorski, S.R. Direct biochemical and neuropharmacological identification of dopamine D₂-receptors in the rabbit carotid body. *Brain Res.* 291: 273-283. 1984.
- Molloy, A.G. and Waddington, J.L. Dopaminergic behaviour stereospecifically by the D-1 agonist R-SK and F38393 and selectively by the D-1 antagonist SCH-23390. *Psychopharmacol.* 82: 409-410. 1984.
- Moore, R.Y. and Bloom, F.E. Central catecholamine neuron systems: Anatomy and Physiology of the dopamine systems. *Ann. Rev. Neuroscience.* 1: 129-189. 1978.
- Morelli, M., Mennini, T., and Di Chiara, G. Nigral dopamine autoreceptors are exclusively of the D₂ type: quantitative autoradiography of [³H]SCH-23982 in adjacent brain sections. *Neuroscience.* 27: 865-870. 1988.
- Munemura, M., Cote, T.E., Tsuruta, K., Eskay, R.L. and Kebabian, J.W. The dopamine receptor in the intermediate lobe of the rat pituitary gland: Pharmacological characterization. *Endocrinology.* 107: 1876-1883. 1980.
- Nauta, W.J.H., Smith, G.P., Faull, R.L.M., and Domesick, V.B. Efferents connections and nigral afferents to nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience.* 3: 385-401. 1978.
- Nestler, E.J. y Greengard, P. Protein phosphorylation in the brain. *Nature.* 305: 583-588. 1983.
- Orrego, F. Criteria for the identification of central neurotransmitters, and their application to studies with some nerve tissue preparations in vitro. *Neuroscience.* 4: 1037-1057. 1979.
- Ottoson, D. *Physiology of the Nervous System.* Ed. The Macmillan Press LTD. Honk kong. 29-39. 1983.
- Quimet, C.C., Miller, P.E., Hemmings, H.C., Walaas, S.I., and Greengard, P. DARPP-32. A dopamine and adenosine 3':5'-monophosphate regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J. Neurosci.* 4: 111-124. 1984.
- Penny, G.R. and Joung, M.Z. Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. *Ann. Rev. Neurosc.* 6: 73-94. 1983.
- Pincock, R.D., Woodruff, G.N., and Turnbull, M.J. Actions of substance P, MIF, TRH, and related peptides in the substantia nigra, caudate nucleus and nucleus accumbens. *Neuropharmacol.* 22: 887-898. 1983.
- Peat, J.A., Woodruff, G.N. and Walling, K.J. Direct effect of a nonfensine derivative on dopamine receptors. *J. Pharm. Pharmacol.* 30: 495-497. 1978.

- Porceddu, M.L., Giorgi, O., Ongini, E., Mele, S., and Biggio, G.
H-SCH 23390 binding sites in the rat substantia nigra: evidence for a presynaptic localization and innervation by dopamine. *Life Sciences*. 39: 321-328. 1986.
- Reid, M.S., O'Connor, W.T., Herrera-Marschitz, M., and Ungerstedt, U. The effects of nigral GABA and dynorphin A injections on striatal dopamine and GABA release: evidence that dopamine provides inhibitory regulation of striatal GABA neurons via D2 receptors. *Brain Res*. 519: 255-260. 1990.
- Ribak, Ch., Vaughn, J.E., and Roberts, E. GABAergic nerve terminals decrease in the substantia nigra following hemitranssections of the striatonigral and pallidonigral pathways. *Brain Res*. 192: 413-420. 1980.
- Rinvik, E., Grofova, I., and Ottersen, O.P. Demonstration of nigroectal and nigroreticular projections in the cat by axonal transport of protein. *Brain Res*. 112: 388. 1976.
- Rinvik, E. and Grofova, I. Observations on the fine structure of the substantia nigra in the cat. *Exp. Brain Res*. 11: 229-248. 1970.
- Roberston, G.S. and Roberston, H.A. D1 and D2 dopamine agonist synergism: separate sites of action?. *TIPS*. 8: 295-299. 1987.
- Rosengarten, H., Schweitzer, J.W. and Friedhoff, A.J. Induction of oral dyskinesias in naive rats by D1 stimulation. *Life Sci*. 33: 2479-2482. 1983.
- Ruffieux, A., and Schultz, W. Dopaminergic activation of reticulata neurons in the substantia nigra. *Natur*. 285: 240-241. 1980.
- Salomone, J.D. Behavioral pharmacology of dopamine systems: a new synthesis. Editado por Willner P. y Scheel-Kruger. John Wiley u Sons Ltd. 599-613. 1991.
- Scheel-Kruger, J. Behavioural and biochemical comparison of amphetamine derivatives, cocaine, benatropine and tricyclic anti-depressant drugs. *Eur. J. Pharmacol*. 18: 63-73. 1972.
- Scheel-Kruger, J., Braestrup, C., Nielsen, M., Colembiowska, K., and Mogilnicka, E. Cocaine: Discussion on the role of dopamine in biochemical mechanism of action. In: Ellingwood E. H., Kilbey M.M. Eds. cocaine and other stimulants. *Adv Behav. Biol*. 21: 373-407. 1977. (New York: Plenum Press)
- Scheel-Kruger, J. Dopamine-GABA interactions evidence that GABA transmits, modulates and mediates dopaminergic functions in the basal ganglia and the limbic systems. *Acta Neurol. Scandinavica. Supl.* 107 (73): 22-58. 1986.

- Schwyn, R.C. and Fox, C.A. The primate substantia nigra: a Golgi and electron microscopic study. *J. Hirnforsch.* 15: 95. 1974.
- Seeman, P. Brain dopamine receptors. *Rev. Pharmacol.* 32: 229-313. 1980.
- Sellstrom, A., Sjöberg, L.B., and Hamberger, A. Neuronal systems for gamma aminobutyric acid metabolism. *J. Neurochem.* 25: 393. 1975.
- Setler, P.E., Sarau, H.M., Sirkle, C.L., and Saunders, H.L. The central effects of a novel dopamine agonist. *Eur. J. Pharmacol.* 50: 419-430. 1978.
- Skirboll, L.R., Grace, A.A., and Bunney, B.S. Dopamine auto- and postsynaptic receptors: Electrophysiological evidence for differential sensitivity to dopamine agonist. *Science* 206(5): 80-82. 1979.
- Snodgrass, S.R. and Iversen, L.L. Effects of amino-oxyacetic acid [³H]GABA uptake by rat brain slices. *J. Neurochem.* 20: 231. 1973.
- Starke, K. Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptors. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmac.* 77: 1-124. 1977.
- Starke, K. Presynaptic receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21: 7-30. 1981.
- Starke, K., Spath, L., Lang, J.D. and Adelung, C. Further functional in vitro comparison of pre- and postsynaptic dopamine receptors in the rabbit caudate nucleus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 323: 298-306. 1983.
- Stoof, J.C., Horn, A. S. and Mulder, A.H. Simultaneous demonstration of the activation of presynaptic dopamine autoreceptors and postsynaptic dopamine receptors in vitro by N,N-dipropyl-5,6-ADTN. *Brain Res.* 196: 276-281. 1980.
- Stoof, J.C., De Boer, Th., Sminia, P. and Mulder, A.H. Stimulation of D₂-dopamine receptors in the rat neostriatum inhibits the release of acetylcholine and dopamine but does not affect the release of γ -aminobutyric acid, glutamate or serotonin. *Eur. J. Pharmacol.* 84: 211-214. 1982.
- Stoof, J.C. and Kebabian, J.W. Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Sciences.* 35: 2281-2296. 1984.
- Swanson, L.W. and Cowan, W.M. A note on the connections and development of the nucleus accumbens. *Brain Res.* 92: 324-329. 1975.
- Syková, E. Extracellular K in the CNS. *Progg. Biophys. Molec. Biol.* 42: 135-189. 1983.

- Szabo, J. Projections from the body of the caudate nucleus in the rhesus monkey. *Exp. Neurol.* 27: 1-15. 1970.
- Tagerud, S.E.O., and Cuello, A.C. Dopamine release from the rat substantia nigra, in vitro. Effect of raphe lesions and veratridine stimulation. *Neuroscience* 4: 2021-2029. 1979.
- Ungerstedt, U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Act. Physiol. Scand. Suppl.* 367: 1- 48. 1971.
- Ungerstedt, U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Act. Physiol. Scand. Suppl.* 367: 49-68. 1971a.
- Ungerstedt, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Act. Physiol. Scand. Suppl.* 367: 89- 93. 1971b.
- Ungerstedt, U. Adipsia and afagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Act. Physiol. Scand. Suppl.* 367: 95-122. 1971c.
- Van der Heyden, J.A.M., Venema, K., and Korff, J. Biphasic and opposite effects of dopamine and apomorphine on endogenous GABA release in the rat substantia nigra. *J. Neurochem.* 34(1): 119-125. 1980.
- Vermes, I., Tilders, F.J.H. and Stoof, J.C. Dopamine inhibits the release of immunoreactive β -endorphine from rat hypothalamus in vitro. *Brain Res.* 326 : 41-46. 1985.
- Voneida, T.J. An experimental study of the course and destination of fibers arising in the head of caudate nucleus in the cat and monkey. *J. Comp. Neurol.* 115: 75-92. 1960.
- Walaas, I. and Fonnum, F. Biochemical evidence for γ -aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience* . 5: 63-72. 1980.
- Walaas, S.I. and Greengard, P. DARPP-32, a dopamine and adenosine 3': 5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine innervated brain regions I. Regional and cellular distribution in the rat brain. *J. Neurosci.* 4: 111-124. 1984.
- Walters, J.R. and Lakoski, J.M. Effect of muscimol on single unit activity of substantia nigra dopamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 47: 469-471. 1978.
- Wassef, M., Berod, A. and Sotelo, C. Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of rat substantia nigra and their striatal input. Combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. *Neuroscience.* 8(11): 2125-2139. 1981.

- Waszczak, B.L. and Walters, J.R. Dopamine modulation of effects of γ -aminobutyric acid on substantia nigra pars reticulata neurons. *Science*. 220: 218-221. 1983.
- Waszczak, B.L. and Walters, J.R. A physiological role for dopamine modulation of GABA effects in substantia nigra: Supersensitivity in 6-hydroxydopamine rats. *Eur. J. Pharmacol.* 105: 369-373. 1984.
- Waszczak, B.L. and Walters, J.R. Endogenous dopamine can modulate inhibition of substantia nigra pars reticulata neurons elicited by GABA iontophoresis or striatal stimulation. *J. Neuroscience*. 6 (1): 120-126. 1986.
- Watling, K.J. and Dowling, J.E. Dopaminergic mechanisms in the teleost retina. I. Dopamine-sensitive adenylate cyclase in homogenates of carp retina: effects of agonists, antagonist and ergots. *J. Neurochem.* 36: 559-568. 1981.
- Weick, B.G., Engber, T.M., Susel, Z., Chase, N.T., and Walters, J.R. Responses of substantia nigra pars reticulata neurons to GABA and SKF-38393 in 6-hydroxydopamine-lesioned rats are differentially affected by continuous and intermittent levodopa administration. *Brain Res.* 523: 16-22. 1990.
- Westfall, T.C., Besson, M.J., Giorgiuffe, M.F., and Glowinsky, J. The role of presynaptic receptors on the release and synthesis of H-dopamine by slices of rat striatum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 292: 279-287. 1976.
- Westfall, T.C. Local regulation of adrenergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 57: 659-728. 1977.
- Wilson, C.J., Chang, H.T., and Kitai, S.T. Origins of post-synaptic potentials evoked in identified rat neostriatal neurons by stimulation in substantia nigra. *Exp. Brain Res.* 45: 157-167. 1982.
- Zigmond, M.J., Abercrombie, E.D., Berger, T.W., Grace, A.A., and Stricker, M.E. Compensations after of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *TINS*. 13(7): 290-296. 1990.