

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

**INTERACCIÓN DE RECEPTORES GABAÉRGICOS A Y B CON
RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1 EN EL CONTROL DE LA
LIBERACIÓN DE GABA EN LA SUSTANCIA NIGRA PARS
RETICULATA DE LA RATA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

CÉSAR JUAN ARMANDO NAVA ASBELL

DIRECTOR DE TESIS: DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

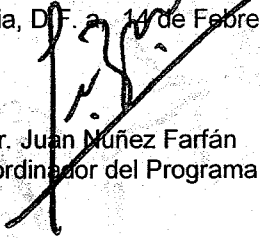
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de Noviembre de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **CÉSAR JUAN ARMANDO NAVA ASBELL** con número de cuenta **73283588** con la tesis titulada: **"Interacción de receptores GABAérgicos A y B con receptores dopaminérgicos D1 en el control de la liberación de GABA en la sustancia nigra pars reticulata de la rata"**, realizada bajo la dirección del **DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO**:

Presidente:	DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
Vocal:	DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
Vocal:	DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO
Vocal:	DRA. LAURA COLÍN BARENQUE
Secretario:	DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO
Suplente:	DR. GABRIEL MANJARREZ GUTIÉRREZ
Suplente:	DR. JORGE ACEVES RUÍZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 14 de Febrero de 2008.


Dr. Juan Muñoz Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al apoyo económico recibido por CONACYT a través de la beca 167275 y al respaldo económico al proyecto 50428-M

Al Comité Tutorial:

Dr. Benjamín Florán Garduño

Dr. Jorge Aceves Ruiz

Dra. Leticia Morales Ledesma

Agradezco al Dr. Benjamín Florán Garduño su apoyo incondicional así como su confianza, paciencia y tolerancia durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Jorge Aceves Ruiz su amable y generosa cooperación durante la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Leticia Morales Ledesma sus certeras y oportunas observaciones en la evaluación del proyecto.

Agradezco a los sinodales Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, Dra. Elvira Galarraga Palacio, Dra. Laura Colín Barenque y Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez su paciencia, el tiempo concedido y sus valiosas observaciones en la revisión del manuscrito.

Agradezco a los técnicos Leonor Florán Garduño y Francisco Paz Bermudez su valiosa asistencia en el desarrollo metodológico del proyecto.

A José Luis Raya su asistencia en la obtención del material biológico para los experimentos de liberación.

Agradezco el apoyo de los amigos del Laboratorio 4 del Departamento de Neurociencias.

Agradezco también a mis compañeros profesores del Módulo de Instrumentación y Laboratorios de la Carrera de Medicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por su comprensión y apoyo.

DEDICATORIA

A mis hijos César Iván, Dana Karen y Aline Angélica

La parte más importante y hermosa de mi vida.

A mis padres César Vicente Nava López y Luz María Asbell Juárez.

Con todo mi amor y admiración eternos.

A Karen Lindsay Klériga García.

Invaluable y bella compañera en mi vida.

Por su inmenso cariño, paciencia y apoyo (Gracias chaparra!)

Con todo mi amor.

A mis hermanos con cariño.

A mi familia.

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

Nava-Asbell, C.; Paz-Bermudez, F.; Erlij, D.; Aceves, J., and Florán, B. GABA(B) receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-mediated facilitation of. *Neuropharmacology*. 2007 Oct; 53(5):631-7.

Nava-Asbell, C. J., Paz-Bermúdez, F., Aceves, J., Erlij, D., Florán, B. GABA A receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of rat. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. San Diego, California, USA. Noviembre 2007.

Nava-Asbell, C., Cortés, H., Paz, F.J., Aceves, J., Erlij, D., Florán, B. GABA B receptors modulate D1 and D2 dopamine receptor-mediated control of glutamate release in substantia nigra pars reticulata. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting. Atlanta, Georgia, USA. Octubre 2006.

Nava-Asbell, C., Paz, F., Aceves, J., Florán, B. Control de la liberación de GABA por receptores GABA A en la sustancia nigra reticulada. XLIX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Querétaro, Qro., México, Septiembre 2006.

Nava-Asbell, C., Paz, F., Florán, L., Aceves, J., Erlij, D., Florán, B. Interactions at adenylyl cyclase level mediate inhibition of D1-stimulated GABA release caused by activation of GABA B receptors in substantia nigra pars reticulata. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting. Washington, DC, USA. Noviembre 2005.

Nava-Asbell, C., Paz, F., Florán, L., Aceves, J., Erlij, D., Florán, B. Interacción de los receptores D1 y GABA B en el control de la liberación de GABA en la parte reticulada de la sustancia nigra. XLVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Guadalajara, Jal., México, Septiembre 2005.

Nava-Asbell, C.J., Silva, I., Florán, L., Aceves, J., Florán, B. Inhibition of GABA release by GABA B receptors in substantia nigra reticulata is mediated by dopamine. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting. New Orleans, Louisiana, USA. Noviembre 2003.

Nava-Asbell, C., Cortez, H., Florán, L., Aceves, J., Florán, B. Los receptores de GABA tipo B inhiben la liberación de GABA en la sustancia nigra de la rata a través de bloquear la liberación de dopamina. XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Aguascalientes, Ags., México, Agosto de 2003.

Nava-Asbell C.J., González, B., Erlij, D., Aceves, J., Florán, B. Activation of NMDA receptors induces contralateral circling behaviour in substantia nigra pars reticulata and ipsilateral in the globus pallidus of the rat. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting. Orlando, Miami, USA., Noviembre 2002.

INDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
GANGLIOS BASALES	14
- Núcleo estriado	15
- Globo pálido	17
- Núcleo subtalámico	18
- Sustancia nigra	19
RECEPTORES GABAÉRGICOS	22
- Receptor GABA A	22
- Receptor GABA B	24
- Receptor GABA C	28
RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS	29
- Receptores dopaminérgicos en el Sistema Nervioso Central	29
- Distribución de los receptores dopaminérgicos en los Ganglios Basales	30
. Receptores dopaminérgicos en el núcleo estriado	30
. Receptores dopaminérgicos en el globo pálido	31
. Receptores dopaminérgicos en el núcleo subtalámico	32
. Receptores dopaminérgicos en la sustancia nigra	33
INTERACCIÓN DA-GABA EN LA SUSTANCIA NIGRA	35
PLANTEAMIENTO DE L PROBLEMA	39
HIPÓTESIS	43
OBJETIVOS	45
METODOLOGÍA	45
- Animales	45
- Preparación de rebanadas de cerebro	46
- Estudios de liberación	46
- Depleción de dopamina endógena por reserpina	48

- Drogas	48
- Análisis de datos	49
RESULTADOS	50
- Dependencia del Ca extracelular de la liberación de [³ H]-GABA	50
- Efecto de la activación de receptores GABA B sobre la liberación de [³ H]-GABA y su dependencia de dopamina	51
- Efecto de los receptores de GABA B sobre la vía de señalización de los receptores D1 que facilitan la liberación de [³ H]-GABA	54
- Efecto de la activación de receptores GABA A sobre la liberación de [³ H]-GABA y su interacción con los receptores D1	58
DISCUSIÓN	62
- Mecanismo y origen de la liberación de [³ H]-GABA en la sustancia nigra	62
- Modulación de la facilitación de la liberación de [³ H]-GABA mediado por receptores D1	64
- Vía de señalización de los receptores D1 y el mecanismo de acción de los receptores GABA B	65
- Modulación de la liberación de GABA por receptores tipo A	67
- Implicaciones funcionales y farmacológicas	69
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es un trastorno crónico degenerativo que se caracteriza por reducción en el movimiento, rigidez y temblor en el reposo. Este padecimiento se origina por la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNc) las cuales, juegan un papel determinante en el funcionamiento de los ganglios basales para procesar la información que proviene de la corteza y determinar características del movimiento como la amplitud, velocidad, duración, además de la facilitación y/o supresión de la intención del mismo. La pars reticulata de la sustancia nigra (SNr) es de crucial importancia en este proceso pues, representando el núcleo de salida de los ganglios basales, determina el estado de activación del tálamo para generar la actividad motora. Es de particular interés conocer cuáles son los eventos que definen la actividad de la SNr en función de los neurotransmisores liberados en su entorno, por lo que este proyecto se realizó con el propósito de describir la interacción de los receptores GABAérgicos del tipo A y B con los receptores dopaminérgicos del tipo D1 en el control de la liberación de GABA. Los resultados obtenidos sugieren que los receptores GABA B inhiben la facilitación de la liberación de GABA estimulada por los receptores dopaminérgicos D1 a través de una interferencia en la vía de señalización intracelular, a nivel de la adenilato ciclasa. Por otra parte, la activación de los receptores GABA A induce una disminución en la liberación de GABA, aunque la ubicación subcelular y el mecanismo de estos receptores para producir su efecto requiere de estudios adicionales. La interacción de los receptores GABAérgicos y dopaminérgicos puede ser considerada en las alternativas terapéuticas farmacológicas para la enfermedad del Parkinson.

ABSTRACT

Parkinson disease is a chronic neurodegenerative process mainly characterized by bradykinesia, stiffness and tremor. It results from death of the dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta which play a significant role in the appropriate function of basal ganglia to convey the cortical information, and set the movement conditions such as amplitude, speed, length as well as facilitation and/or inhibition. The role of substantia nigra pars reticulata is pivotal in this process, because, it has been considered as the output nucleus of basal ganglia, and determine the activation state of thalamic neurons to induce or suppress motor behavior. To know the events defining the SNr activity by neurotransmitter release in the nigral milieu, this project was aimed to describe the interaction between GABA A and GABA B receptors with dopamine D1 receptors in controlling GABA release at this level. The results suggest that GABA B receptors inhibit dopamine D1 receptor-mediated facilitation of GABA release by interfering with the D1 signaling pathway at adenylyl-cyclase level. Besides, activation of GABA A receptors induced a decrease in GABA release but subcellular location and mechanisms requires further studies. GABA and dopamine receptors interaction should be considered in an alternative therapeutic for Parkinson disease.

INTERACCIÓN DE RECEPTORES GABAÉRGICOS A Y B CON RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1 EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GABA EN LA SUSTANCIA NIGRA PARS RETICULATA DE LA RATA.

INTRODUCCIÓN

Como resultado de diversos estudios acerca de la organización anátomo-funcional de los ganglios basales, se ha propuesto un modelo, según el cual, el núcleo estriado (núcleo de entrada de los ganglios basales) transmite el flujo de información excitatoria (por acción glutamatérgica) que proviene de la corteza motora, hacia los núcleos de salida de los ganglios basales constituidos por la sustancia nigra pars reticulada y el globo pálido interno, a través de dos circuitos denominados vía directa e indirecta. El procesamiento de la información por estos circuitos además de la interacción de ambas vías, permite al sujeto evaluar los parámetros relativos al movimiento como la amplitud, velocidad y duración, así como la facilitación y/o supresión de la intención de movimiento (Galván y Wichmann, 2007).

El resultado funcional derivado de la organización de los circuitos en los ganglios basales, es que la activación de las vías directa e indirecta conlleva a cambios opuestos en la salida de información de los ganglios basales. De esta manera, la activación de las neuronas estriatales GABAérgicas de la vía directa provoca inhibición de los núcleos de salida lo que favorece la activación del tálamo, normalmente bajo control inhibitorio por las proyecciones de dichos núcleos, lo cual produce activación de la corteza motora y la iniciación del movimiento (Albin et al., 1989; Alexander y Crutcher, 1990; Gerfen, 1992; Graybiel, 1990).

En la vía indirecta, la activación de las neuronas estriatales produce una inhibición en el globo pálido lateral con una subsecuente desinhibición del núcleo subtalámico cuyas proyecciones glutamatérgicas aumentan la actividad de los núcleos de salida aumentando, por tanto, el control inhibitorio del tálamo y disminuyendo éste su efecto excitatorio en la corteza (Alexander y Crutcher, 1990; De Long, 1990). (Ver figura 1).

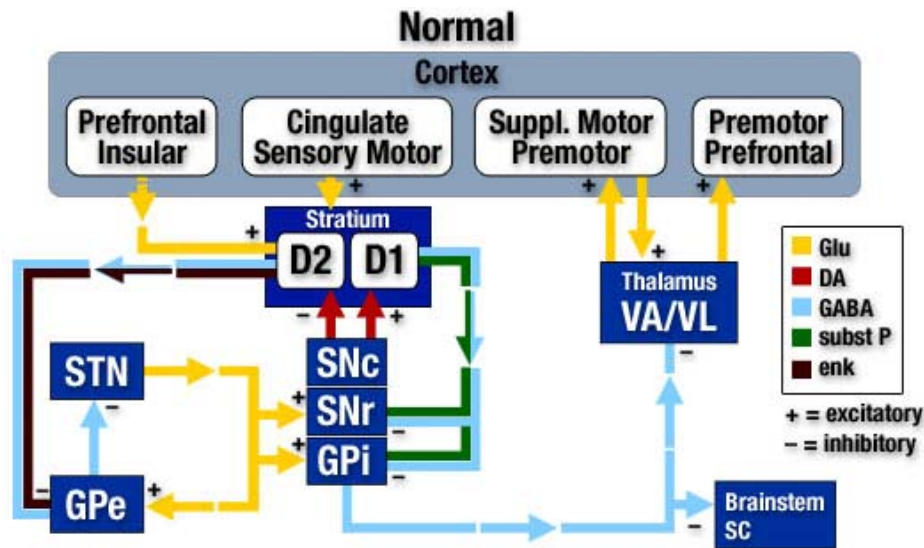


Figura 1. Representación esquemática de la organización funcional del circuito motor de los ganglios basales de acuerdo al modelo clásico de las vías directa e indirecta. GPe: globo pálido externo, GPi: globo pálido interno, SNc: sustancia nigra pars compacta, SNr: sustancia nigra pars reticulata, STN: núcleo subtalámico, VA: región ventral anterior del tálamo, VL: región ventral lateral del tálamo, SC: colículo superior, RF: formación reticular.

Dentro de este esquema, la pars compacta de la sustancia nigra juega un papel clave en la fisiología de los ganglios basales. Este núcleo está integrado por neuronas dopaminérgicas que inervan de manera densa todas las regiones del núcleo caudado y el putamen (Lavoie et al., 1989; Graybiel, 1990; Prensa et al., 1999) donde, junto al glutamato liberado de las proyecciones corticales, modula el flujo de información hacia las vías GABAérgicas estriado-palidales y estriado-nigrales (Bolam et al. 2000; Balon et al, 2002). El efecto aparente de la dopamina liberada a nivel estriatal es la facilitación de la transmisión en

la vía directa e inhibición en la vía indirecta a partir de la activación de receptores dopaminérgicos de la familia D1 y D2 respectivamente, localizados en el soma y proyecciones dendríticas de las neuronas estriatales (Wu et al., 2000; Parent et al., 2001).

La integración de los diversos componentes neuronales de los ganglios basales así como de los neurotransmisores liberados por estos, reviste gran importancia a fin de poder describir desde un punto de vista fisiológico cuales son los elementos que se hayan implicados en las alteraciones que finalmente derivan en los trastornos motores. Desde este punto de vista, es de particular importancia tomar en consideración una serie de factores inmersos en el proceso de transmisión sináptica como son: la cantidad de neurotransmisor liberado, sus características neuroquímicas, la densidad e interacción de las sinapsis en el entorno, el número y tipo de receptores disponibles así como su localización celular y subsináptica y en función de estos aspectos, su secuencia de activación entre otros.

Los mecanismos que generan las señales de salida de los ganglios basales durante la actividad motora y en condiciones de reposo, parecen consistir de un complejo patrón espacio-temporal de aumento y disminución de disparo neuronal involucrando además de los elementos referidos anteriormente, la interacción presináptica de receptores sin embargo, el proceso fino y detallado para explicar el control del movimiento no ha podido ser clarificado por completo.

Para esta labor, deben considerarse cuáles son los efectos que derivan de la interacción de los neurotransmisores GABA, dopamina y ácido glutámico en núcleos clave para el procesamiento de la información derivada del núcleo estriado como lo es la sustancia nigra reticulada. Así como el efecto que tienen estos neurotransmisores en la secuencia de

activación e inactivación de los diferentes tipos de receptores los cuales, podrían estar determinando a su vez la secuencia de los eventos neuronales que definirán las características de la información de salida en los ganglios basales y en última instancia, los procesos motores.

LOS GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales comprenden un grupo de núcleos nerviosos que juegan un papel determinante en las funciones motoras particularmente en la planeación, iniciación y ejecución del movimiento (Albin et al. 1989). Aunque el término “ganglios basales” no tiene limitaciones o definiciones precisas, desde el punto de vista de desarrollo se refiere a los componentes estriatales y palidales del telencéfalo basal el cual evoluciona de las eminencias ganglionares lateral y medial. En los mamíferos estas estructuras incluyen al núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, globo pálido y pálido ventral. Debido a la estrecha relación a los circuitos estriado-palidales, se considera parte de ellos a otras estructuras del telencéfalo y mesencéfalo como el núcleo subtalámico, área ventral tegmental y sustancia nigra (Smeets et al. 2000) la cual está constituida a su vez por las regiones compacta y reticulada.

A través de los ganglios basales fluye la información cortical desde el núcleo estriado considerado el núcleo de entrada hasta los núcleos de salida conformados por la sustancia nigra pars reticulata y el globo pálido interno. Este flujo de información es transmitido por las vías indirecta y directa. La primera comprende los sistemas estriadopalidales dorsal o motor y ventral o límbico. El sistema estriadopalidal dorsal consiste del estriado dorsal o núcleo estriado (núcleo caudado y putamen en primates y felinos, caudoputamen en otros mamíferos) y globo pálido dorsal, estructura dividida en dos regiones con diferente conectividad: el segmento externo del globo pálido (GPe en primates) o globo pálido (GP en no primates) y el segmento interno del globo pálido (GPi en primates) o núcleo entopeduncular (NE en no primates). Por otra parte, el sistema estriadopalidal ventral lo constituye el estriado ventral (núcleo accumbens y parte del tubérculo olfatorio) y el globo

pálido ventral. (Medina y Reiner, 1995; Smeets et al. 2000). Esta vía proyecta hacia el núcleo subtalámico y posteriormente a los núcleos de salida.

Por otra parte, la vía directa es una ruta monosináptica que parte de la matriz estriatal hacia la porción reticulata de la sustancia nigra.

Núcleo estriado

El modelo actual de los ganglios basales, propuesto en la década de los 80's (Penney y Young, 1983; Alexander et al. 1986; Albin et al. 1989; DeLong, 1990), considera al núcleo estriado como la estructura de entrada al sistema recibiendo múltiples aferencias excitatorias glutamatérgicas de la corteza cerebral. La información transmitida por estas fibras es canalizada hacia los núcleos de salida constituidos por el globo pálido interno y la sustancia nigra pars reticulata (ver figura 1).

Se han descrito dos tipos principales de neuronas de proyección tanto en el estriado dorsal como en el estriado ventral. Ambos tipos de neuronas se caracterizan por ser de un tamaño medio (20-25 μm), con dendritas espinosas y que liberan al neurotransmisor ácido γ -amino butírico (GABA) pero con diferente neuropéptido (Albin et al. 1989; Graybiel, 1990; Reiner y Anderson, 1990; Parent et al. 1995; Reiner et al. 1999) así, un grupo de neuronas estriatales colibera sustancia P y dinorfina mientras que el otro grupo de neuronas colibera encefalina (Gerfen y Wilson, 1996; Smeets et al. 2000). Aun cuando ambos grupos de neuronas proyectan a los núcleos de salida, las neuronas dinorfinérgicas lo hacen de manera monosináptica constituyendo así la denominada "vía directa" (Smith y Bolam, 1991; Bolam et al., 1993); mientras que las neuronas encefalinérgicas estriatales alcanzan los núcleos de salida a través de inervaciones que proyectan primero al GPe y después al núcleo

subtalámico (NST) dando lugar a la “vía indirecta” (Albin et al. 1989; Smith et al. 1998). Ambos tipos de neuronas estriado-fugales proyectan un axón colateral que permanece dentro del estriado en un área aproximada al soma de la célula de origen (Kawaguchi et al. 1990).

Además de las neuronas de proyección que constituyen alrededor del 90-95 % (Merello y Cammarota, 2000), el núcleo estriado contiene varias neuronas de circuitos locales (interneuronas) las cuales pueden ser colinérgicas o GABAérgicas (Centonze et al. 2003). Las interneuronas colinérgicas son neuronas grandes no espinosas que participan en la modulación de la información de salida estriatal (Galarraga et al. 1999). Por otra parte, las interneuronas GABAérgicas, medianas o pequeñas, no espinosas, ejercen un poderoso control inhibitorio en las neuronas estriatales de proyección. Existen al menos tres tipos de interneuronas GABAérgicas dependiendo de su contenido químico: 1) células GABAérgicas que contienen parvalbumina; 2) células GABAérgicas que contienen calretinina y 3) células GABAérgicas que contienen somatostatina, sintasa de óxido nítrico y péptido Y (Kawaguchi et al. 1995; Gerfen y Wilson, 1996).

Un aspecto importante es el hecho de que las neuronas del cuerpo estriado expresan receptores dopaminérgicos D1 y D2, los cuales controlan el efecto modulador ejercido por la dopamina liberada por las neuronas nigroestriatales. Aparentemente, los receptores D1 y D2 están segregados funcionalmente en los dos subtipos de neuronas estriatales descritos anteriormente, tanto a nivel del soma como de las terminales, de tal manera que los receptores D1 se encuentran en las neuronas que proyectan a la porción reticulada de la sustancia nigra y al núcleo entopedúncular (vía directa) (Barone et al., 1987; Florán et al., 1990; Aceves et al., 1992), mientras que los receptores D2 aparecen en las neuronas que inervan al globo pálido (Gerfen, 1992; Gerfen et al., 1995; Florán et al., 1997). Los

receptores D1 están asociados con el proceso facilitador de la liberación de GABA en la vía directa mientras que, los receptores D2, actúan de manera inhibitoria sobre la liberación de GABA y están asociados a la vía indirecta del circuito de los ganglios basales. En consecuencia, podría considerarse que la dopamina tiene un aparente papel permisivo sobre el flujo de información de los ganglios basales al facilitar la activación de la vía directa sobre la indirecta, sincronizando la activación de la corteza por ambas vías y facilitando de esta manera la actividad motora.

Cabe mencionar que de acuerdo al arreglo neuronal del núcleo estriado, los estriosomas proyectan eminentemente hacia la porción compacta de la sustancia nigra (Misgeld, 2004).

Globo pálido

El núcleo denominado globo pálido externo (GPe) es componente de la vía indirecta de los ganglios basales. La mayoría de las neuronas palidales presentan inmunorreactividad para la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) lo que les confiere su naturaleza GABAérgica (Smith et al. 1987). Existen dos tipos principales de neuronas palidales, un grupo de neuronas con somas medianos, con inmunorreactividad a parvalbúmina y proyecciones dendríticas no espinosas que emite colaterales axónicas al núcleo subtalámico, núcleo entopeduncular y sustancia nigra (Smith et al., 1998; Bolam et al., 2000), y un grupo de neuronas con somas más pequeños y dendritas con espinas cuyos axones proyectan principalmente al núcleo estriado (Kita y Kitai, 1994; Gerfen y Wilson, 1996; Bevan et al., 1998; Billings y Marshall, 2004).

En el globo pálido existen terminales del estriado con receptores del tipo D2 (Gerfen et al., 1990; Florán et al., 1997; Cooper y Stanford, 2001) y colaterales con receptores D1 provenientes de la vía estriado-nigral (Kawaguchi et al., 1990; Florán et al., 1990). El globo pálido recibe además aferencias colaterales del núcleo subtalámico cuyas terminales se encuentran bajo control dopaminérgico vía receptores presinápticos del tipo D2/D3 (Hernández et al., 2006) y D1 (Hernández et al., 2007) de proyecciones provenientes de la pars compacta de la sustancia nigra (Lindvall y Björklund, 1979; Prensa y Parent, 2001; Debeir et al., 2005).

Núcleo subtalámico

El núcleo subtalámico (NST) es considerado como parte de los ganglios basales dada la estrecha relación con el resto de los núcleos de este circuito. El NST se localiza en el cerebro medio sobre la superficie dorsomedial de la cápsula interna. Este núcleo está constituido por neuronas ovoides o poligonales de 11 a 18 μm de diámetro que emiten dendritas que tienden a dispersarse en patrones diversos dentro del núcleo. El NST emite proyecciones profusas a ambos segmentos del globo pálido (Kita y Kitai, 1987; Gillies y Willshaw, 2004; Smith et al., 1994)) y en menor densidad a la pars reticulata de la sustancia nigra (Gillies y Willshaw, 2004). Siendo el único núcleo de los ganglios basales que contiene neuronas glutamatérgicas, el núcleo subtalámico realiza una función crítica en el funcionamiento de la vía indirecta aportando un componente excitatorio a los núcleos de salida de este circuito motor (Gerfen y Wilson, 1996; Chen y Yung, 2005).

Sustancia nigra

La sustancia nigra es un núcleo conformado por dos regiones funcionalmente diferentes, la pars compacta (SNc) localizada dorsalmente y la pars reticulata (SNr) localizada ventralmente. La SNc está integrada por un grupo de neuronas dopaminérgicas las cuales proyectan rostralmente y modulan el flujo de información a través del circuito de los ganglios basales. Por otra parte, la SNr está constituida por neuronas de proyección GABAérgicas que, junto con el segmento interno del globo pálido (GPi), conforma un complejo de neuronas GABAérgicas que han sido denominados núcleos de salida de los ganglios basales (Boyes y Bolam, 2003) debido a que constituyen la interfase con áreas cerebrales externas a este circuito como el tálamo y otras estructuras del cerebro medio.

Las neuronas de la pars reticulata y pars compacta de la sustancia nigra presentan somas de forma irregular de 8 a 50 μm de diámetro. Ambas regiones reciben principalmente aferencias GABAérgicas del núcleo estriado, globo pálido externo y de recurrentes de neuronas nigrotalámicas. Además, la sustancia nigra recibe entradas glutamatérgicas provenientes de los núcleos subtalámico, pedunculopontino y corteza prefrontal (Kita y Kitai, 1987; Charara et al., 1996). Aparentemente, las proyecciones dendríticas nigrales hacen sinapsis en sus regiones proximales con las terminales del globo pálido externo y en las porciones distales con las terminales del núcleo subtalámico (Kita y Kitai, 1987).

Los axones de proyección de las neuronas de la pars reticulata se dirigen principalmente a las regiones motoras del tálamo y emiten colaterales que inervan la porción compacta de la sustancia nigra (Deniau et al., 1982).

En la porción reticulada de la sustancia nigra coinciden terminales estriatales que expresan receptores a dopamina tipo D1 (Florán et al 1990; Wamsley et al., 1991; Yung et al., 1995; Rosales et al., 1997) y receptores a GABA de tipo B (Florán et al 1988; Shen y Johnson, 1997); terminales subtalámicas con receptores D1 (Flores et al., 1999; Rosales et al., 1997) , D2(Ibáñez-Sandoval et al. 2006) y GABA B (Shen y Johnson, 1997); además de proyecciones excitatorias glutamatérgicas provenientes de la amígdala, núcleo pedúnculo pontino y habénula (Misgeld, 2004) y proyecciones dendríticas de la sustancia nigra compacta (Björklund y Lindvall, 1975) con receptores a dopamina de tipo D2 y al ácido glutámico del tipo NMDA (Rosales et al., 1997) y aparentemente receptores GABA B (Engberg et al., 1993, García et al 1997).

Aunque hasta hace poco se pensaba que la inervación de la sustancia nigra compacta se dirigía exclusivamente al estriado, algunos estudios sobre la organización de la inervación dopaminérgica de los ganglios basales, sugieren que ésta es más compleja de lo que se pensaba. Si bien es cierto que las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta inervan de manera densa al estriado, se ha podido establecer que adicionalmente emiten proyecciones extraestriatales al subtálamo, al globo pálido externo (Prensa et al., 1999; Cossette et al., 1999), así como una proyección dopaminérgica a través de ramificaciones dendríticas hacia la sustancia nigra reticulada (Cheramy et al., 1981; Rosales et al. 1997; Parent et al., 2001; Prensa et al., 2001). Algunos estudios conductuales y neuroquímicos sugieren que la inervación dopaminérgica extraestriatal es tan importante para el control del movimiento como la estriatal misma (Galván et al., 2001; Hauber y Lutz, 1999; Robertson y Robertson, 1988), sin embargo, la descripción de la inervación dopaminérgica dista mucho de lograrse de manera precisa pues debe considerarse una posible diversidad neuronal de al menos cinco

tipos diferentes de neuronas dopaminérgicas inmersas en la pars compacta (González-Hernández y Rodríguez, 2000).

Los diferentes tipos de neuronas dopaminérgicas podrían estar relacionados a una especialización funcional en los sitios de proyección estriatal y extraestriatal así como a diferentes niveles de supervivencia en casos de neurodegeneración, pues se sabe por ejemplo que las neuronas dopaminérgicas que inervan el globo pálido manifiestan cierto grado de resistencia a agentes inductores de Parkinson (Prensa y Parent, 2001).

En condiciones de reposo, la señal de salida de los ganglios basales (en la sustancia nigra reticulada y núcleo entopeduncular) es de naturaleza inhibitoria, la cual se pierde durante el movimiento como resultado del cambio de actividad de las neuronas en las vías directa e indirecta. Así, las neuronas estriatales de proyección se encuentran inactivas en condiciones de reposo, mientras que las neuronas de salida presentan una tasa alta de disparo la cual es mantenida aparentemente por la actividad de las inervaciones que provienen del núcleo subtalámico (Bevan y Wilson, 1999; Nakanishi et al., 1987) y que tienen a su vez un efecto tónico inhibitorio de las neuronas talámicas. Cuando el sistema se activa por la descarga de las neuronas glutamatérgicas de la corteza, se activan las neuronas estriatales de la vía directa produciendo una inhibición en las neuronas de salida de la sustancia nigra reticulada y núcleo entopedúncular. La reducción en la actividad basal de estas neuronas deriva en una desinhibición de las células talámicas y corticales manifestándose el movimiento. En contraste, la activación de la vía indirecta produce un aumento en la tasa de disparo de las células de salida aumentando la inhibición de los núcleos blanco de los ganglios basales y por tanto, inhibición también del movimiento.

RECEPTORES GABAÉRGICOS

El ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC, ejerce su efecto a través de receptores ionotrópicos (receptores GABA A y GABA C) y metabotrópicos (receptores GABA B), los cuales fueron descubiertos en función de sus propiedades farmacológicas. A través de la activación de estos receptores las células nerviosas desarrollan una disminución en su actividad que puede ser transitoria o a largo plazo dependiendo del tipo de receptor activado. Esta característica de los receptores GABAérgicos ha hecho posible implementar acciones terapéuticas dirigidas al control de trastornos de ansiedad, epilepsia y disturbios del sueño entre otros (Bettler et al., 2004).

Receptor GABA A

Los receptores GABA A y C tienen un tamaño aproximado de 275 KDa y están constituidos por 5 subunidades que conforman un poro para el ión Cl^- . Cada subunidad, con un peso aproximado de 50 KDa, tiene un extremo terminal amino extracelular largo, 4 dominios transmembranales (M1-M4), una secuencia intracelular larga entre los dominios M3 y M4 y un extremo terminal corto extracelular. Hasta el momento, se han identificado 18 subunidades diferentes las cuales se han agrupado en 7 familias: α 1-6, β 1-4, γ 1-2, δ , ρ 1-3, ϵ , π (Waldvogel et al. 1999; Mohler 2006). A partir del gran número de recombinaciones entre estas subunidades, los receptores GABA A presentan un alto grado de heterogeneidad aunque se sabe que en el SNC, los receptores GABA A están compuestos en su gran mayoría por la combinación de las subunidades α_1 , β_2 , γ_2 en proporción 2:2:1.

Las formas heteroméricas de este receptor se conforman por las subunidades de las familias α , β , γ , δ . Las variantes homoméricas del receptor están constituidas por subunidades

del tipo ρ , descrito en retina y en músculo liso gastrointestinal (Fletcher et al., 2001). El receptor GABA C se ha considerado como una variante especializada del receptor GABAérgico tipo A (Metha y Ticku, 1999), aunque otros autores sugieren que el receptor GABA A evolucionó del receptor GABA C (Nestler et al., 2001).

Dada la heterogeneidad en las subunidades y al hecho de que estas presentan diversos sitios de acción para diferentes ligandos (benzodiazepinas, barbituratos, etanol y esteroides) (Sieghart, 1995), los receptores GABA A pueden exhibir variaciones en el grado de afinidad hacia el ligando, la potencia del agonista así como la cinética de desensibilización y fosforilación lo cual redundaría en una amplia farmacología como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Agonistas y antagonistas GABAérgicos para los diferentes sitios de acción del receptor GABA A.

Sitio de unión	Agonistas	Antagonistas
GABA	Muscimol Isoguvacina THIP Ácido piperidin-4-sulfónico	Bicuculina Pitrazepina Securinina Gabazina Picrotoxina (nc) Pentilenetetrazol (nc)
Benzodiazepinas	Diazepam Clordiazepoxido Lorazepam Alprazolam DMCM (ai) B-carbolina (ai)	Flumazenil ZK 93426
Barbituratos	Pentobarbital Phenobarbital Methaqualona	
Esteroides	Hidrato de Cloral	

Las subunidades del receptor GABA A conforman un poro que al ser activado por GABA facilita el flujo del ión Cl^- hacia el interior de la neurona induciendo un rápido y transitorio estado de hiperpolarización que disminuye la actividad neuronal y que, en términos de la transmisión GABAérgica, es mantenido hasta el desplazamiento del agonista por mecanismos de recaptura o la internalización del receptor la cual parece estar mediada por la protein cinasa C (PKC) (Chapell et al., 1998).

Los receptores GABAérgicos del tipo A se han localizado en diferentes áreas del SNC presentando en cada una de estas una configuración específica (ver, Farrant y Nusser, 2005). Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que la localización subcelular del receptor GABA A es eminentemente postsináptica, existen reportes en los cuales se evidencia que juegan un papel en la presinápsis (Hashimoto y Kuriyama, 1997; Jang et al., 2006; Ercoli et al., 2007) e incluso se han referido en regiones extrasinápticas (Richerson, 2004; Kullman et al., 2005; Farrant y Nusser, 2005).

Receptor GABA B

Los receptores GABAérgicos del tipo B son receptores metabotrópicos de aproximadamente 80 KDa, insensibles a bicuculina, con siete dominios transmembranales y pertenecen al grupo C de la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G de membrana, los cuales poseen como característica una porción extracelular larga (Wise et al. 1999; Charles et al 2003). La activación de estos receptores puede regular la activación de canales iónicos así como cascadas de señalización intracelulares (Charara et al 2000).

A diferencia de la mayoría de los receptores metabotrópicos, se ha establecido que la propiedad funcional de los receptores GABAérgicos del tipo B requiere de la

heterodimerización de dos subunidades (White et al. 1998; Kaupmann et al. 1998; Galvez et al. 2001; Thuault et al. 2004; Bettler et al., 2004) que, aunque presentan un alto grado de homología entre sí, participan de manera muy específica en la secuencia de señalización celular. Así, se han podido reconocer que las subunidades constitutivas de este receptor son: la subunidad GABA BR_{1(a y b)} (Cryan y Kaupmann, 2005) y la subunidad GABA BR₂ (Bettler et al. 2004). La subunidad GABA BR₁ está asociada a la unión del ligando en la superficie celular mientras que la subunidad GABA BR₂ se encuentra asociada al transporte del complejo GABABR₁/GABABR₂ a la superficie membranal desde el retículo endoplásmico así como a la secuencia efectora de señalización a partir de su unión a la porción α de la proteína G (Bowery y Enna 2000; Couve et al. 2000, 2002; Calver et al. 2001, Kniazeff et al. 2002; Charles et al 2003; Charara et al. 2004). Aunque la participación de estas subunidades ha descrito adecuadamente la funcionalidad del receptor GABA B, se ha sugerido la posible existencia de subunidades adicionales (Charles et al 2003).

Los receptores GABAérgicos del tipo B se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC (Waldvogel et al, 2004) en diversos tipos de neuronas además de células gliales (Cryan y Kaupmann, 2005). El receptor GABA B se encuentra asociado a proteínas G heterotriméricas de membrana del tipo G_i α /G_o α (Bettler et al. 2004) a través de las cuales inhibe a la adenilato ciclasa de los tipos I, III, V (forma predominante en encéfalo) y VII con una consecuente disminución en la concentración de cAMP y reducción en la activación de la protein cinasa A (PKA) elemento importante en el funcionamiento de la maquinaria excitotónica (ver Sudhof, 2004; Seino y Shibasaki, 2005) e inactivación de los canales de calcio P/Q (Sakurai et al., 1995) . Aunque esta es la principal secuencia efectora de este receptor, se sabe que los tipos de adenilato ciclasa II, IV y VII también presentes en el SNC,

son estimuladas por la subunidad $\beta\gamma$ en presencia de $G\alpha$'s constitutivas de otros receptores asociados a proteínas G (Simonds, 1999). Tanto $G_i\alpha$ como $G_o\alpha$ son sensibles a la toxina de *Bordetella pertussis* la cual mediante ADP-ribosilación, desacopla a la subunidad α del receptor y estabiliza su asociación con las subunidades $\beta\gamma$ (Schroeder et al. 2004).

El mecanismo efector inhibitorio del receptor GABA B depende de su localización celular; así, presinápticamente (autorreceptores o heterorreceptores), los receptores GABA B aparentemente reducen las corrientes entrantes de Ca^{2+} del tipo N o P/Q (Arias-Montaña et al., 2007) vía subunidades $\beta\gamma$ (Bettler et al. 2004) atenuando de esta manera los eventos excitotóxicos dependientes de este ión (Bowery et al. 2002; Calver et al. 2002; Bettler et al. 2004). Postsinápticamente y también a través de las subunidades $\beta\gamma$, el receptor modifica la conductancia de canales rectificadores de K^+ tipo Kir-3 (Gassman et al. 2004) favoreciendo la hiperpolarización neuronal (Bowery 1989; Misgeld et al. 1995; Bowery et al, 2002; Enna, 2001).

Aunque se sabe que los receptores GABA B se encuentran ampliamente distribuidos (Liang et al., 2000; Waldvogel 2004), mediante la realización de registros electrofisiológicos se ha podido sugerir la naturaleza presináptica del receptor GABA B (Giralt et al. 1990; Shen y Johnson, 1997; Chan et al. 1998; Chan y Yung, 1999; Paladini et al., 1999); sin embargo, los estudios de inmunocitoquímica y binding han podido establecer de manera más fina la ubicación celular y subcelular del receptor GABA B considerando algunos aspectos propios de la molécula que lo constituye, como la necesaria dimerización de las subunidades para constituir un receptor funcional (Jones et al., 1998) y el hecho de que aunque la subunidad GABA BR₂ puede expresarse sola en la membrana celular, no ha podido demostrarse la existencia de homodímeros de esta subunidad; además, la subunidad GABA BR₁ requiere de

la dimerización para liberarse del retículo endoplásmico y viajar a la superficie celular (Couve et al. 1998).

Varios estudios han reportado que en los ganglios basales las neuronas de proyección GABAérgicas del núcleo estriado, globo pálido y sustancia nigra reticulata muestran un débil marcaje para el receptor GABA B, excepto en las interneuronas donde la marca es más densa (Margeta-Mitrovic et al., 1999; Charara et al. 2000, 2004; Waldvogel et al., 2004). Si bien se ha detectado una débil expresión del receptor en la sustancia nigra, se ha demostrado que existe colocalización de las subunidades GABA BR₁ y GABA BR₂ en ambas porciones de este núcleo (Liang et a., 2000; Boyes y Bolam, 2003), aunque ha sido evidente que la inmunorreactividad aparece predominantemente en la SNc lo que sugiere su expresión postsináptica (Margeta-Mitrovic et al., 1999; Charles et al. 2001). Por otra parte, el reducido marcaje para el receptor en la pars reticulata, con predominio en el neurópilo (Waldvogel et al., 2004) sugiere la localización presináptica en regiones preterminales, extrasinápticas e incluso la existencia de otras formas de heterodímeros para el receptor GABA B aun no clonados (Charara et al., 2000). Sin embargo, estudios más recientes han referido un marcaje significativo para ambas subunidades en la pars reticulata (Waldvogel, 2004). Esta diferencia podría deberse a las variaciones en la especificidad de los anticuerpos usados por cada grupo de estudio. Los receptores GABA B localizados en regiones preterminales y extrasinápticas podrían ser activados por el GABA que inunda la región sináptica (spillover) desde las terminales GABAérgicas circundantes (Charara et al., 2004)

La referencia de una densa inmunorreactividad para la subunidad GABABR₁ en la región intracelular de la pars compacta de la sustancia nigra (Ng y Yung 2000) podría indicar que el heterodímero puede encontrarse en fase migratoria hacia la superficie de membrana o

que la subunidad GABA BR₁ aguarda la dimerización en el retículo endoplásmico (Boyes y Bolam, 2003), mientras que la expresión de la subunidad GABA BR₂ en el neurópilo de ambas porciones de la SN (Ng y Yung 2001; Boyes y Bolam, 2003) apoya la presencia de receptores GABA B funcionales en la presinapsis donde juegan un papel modulador en la liberación de neurotransmisor tanto de terminales GABAérgicas como glutamatérgicas (Shen y Johnson, 1997; Boyes y Bolam, 2003).

Receptor GABA C

Los receptores GABAérgicos del tipo C son complejos homoméricos constituídos por 5 subunidades del tipo ρ (1 – 3) y se han descrito en neuronas bipolares de la retina (Palmer, 2006). Al igual que los receptores GABAérgicos del tipo A, estas subunidades conforman un poro iónico permeable al Cl⁻ pero exhiben resistencia a la bicuculina y al baclofén. A diferencia de la corriente rápida y transitoria de los receptores GABA A, los receptores GABA C producen una corriente de cloruro que decae lentamente hasta formar un flujo tónico (Palmer, 2006; Eggers y Lukasiewicz, 2006).

RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

La dopamina es la catecolamina mas abundante en el cerebro de mamíferos en donde actúa como neurotransmisor para la modulación de un gran número de funciones como la actividad locomotora, cognición, emoción, reforzamiento positivo, ingesta alimenticia y regulación endócrina (Missale et al., 1998), es particularmente importante su relación con alteraciones patológicas como la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia y síndrome de Tourette (Vallone et al., 2000).

Los principales núcleos dopaminérgicos en el cerebro de la rata son: 1) la pars compacta de la sustancia nigra, 2) el área tegmental ventral y 3) el núcleo arcuado (Nestler et al., 2001). Estas áreas dan lugar a cuatro vías de proyección: 1) la vía nigroestriatal, que se origina de la sustancia nigra pars compacta y que inerva al estriado dorsal (caudo-putamen) y que esta relacionada en el control del movimiento. Su degeneración provoca la enfermedad de Parkinson. 2) la vía mesolímbica, se origina del área tegmental ventral e inerva al estriado ventral (núcleo accumbens), al tubérculo olfatorio y otras regiones del sistema límbico. Esta vía esta relacionada en la conducta motivada. 3) la vía mesocortical, se origina también del área tegmental ventral e inerva diferentes regiones de la corteza frontal. Esta vía parece estar relacionada con aspectos del aprendizaje y memoria. 4) la vía tuberoinfundibular, se origina del núcleo arcuado en el hipotálamo y sus proyecciones llegan a la eminencia media del hipotálamo y que participa en las funciones endocrinas (Vallone et al., 2000).

Receptores dopaminérgicos en el Sistema Nervioso Central.

La dopamina ejerce su efecto al activar a receptores específicos de membrana los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G con siete dominios

transmembranales. Se han aislado cinco tipos diferentes de receptores dopaminérgicos los cuales se han caracterizado y subdividido en dos subfamilias con base a sus propiedades bioquímicas y farmacológicas; la subfamilia D1-like y D2-like. La subfamilia D1-like comprende a los receptores D1 y D5 y la subfamilia D2-like incluye a los receptores D2 (con variantes D2S y D2L), D3 y D4. La diferencia en las variantes del receptor D2, reside en una secuencia de 29 aminoácidos que se inserta en el asa intracelular 3. Aparentemente, la variante corta (D2S) está asociada a la transmisión dopaminérgica presináptica y mientras que la variante larga (D2L) participa en la transmisión dopaminérgica postsináptica (Lindgren et al., 2003). Los receptores D1 y D5 comparten una similitud del 80% en su secuencia de aminoácidos transmembranales, mientras que los receptores D2 y D3 tienen una similitud del 75% y los receptores D2 y D4, 53% (Vallone, et al., 2000).

Distribución de los receptores dopaminérgicos en los Ganglios Basales.

Receptores dopaminérgicos en el Núcleo Estriado

Mediante estudios de farmacología, se ha podido establecer que los receptores de la familia D1 se localizan en las espinas dendríticas de las neuronas espinosas estriatales (Scott et al., 2002), mientras que los receptores D5 se encuentran en las interneuronas productoras de óxido nítrico (Centonze, et al., 2003), además de las interneuronas no espinosas colinérgicas y en las interneuronas positivas para parvalbúmina (Centonze, et al., 2003b).

Por otra parte, se ha referido que los receptores de la familia D2 se encuentran eminentemente en el estriado dorsal, en las neuronas espinosas medianas que inervan al globo pálido (Gerfen, 1992; Gerfen et al., 1995; Florán et al., 1988; Florán et al., 1990; Lindgren et al., 2003) y más recientemente se ha comprobado, además, su presencia en las

interneuronas colinérgicas (Sano et al., 2003; Alcantara et al., 2003), donde se ubican aparentemente en los somas y sus proyecciones dendríticas (Alcantara et al., 2003).

Como se comentó anteriormente, los receptores dopaminérgicos del tipo D3 se expresan de manera abundante en el sistema límbico, predominantemente en la porción ventral del estriado o núcleo accumbens (Boeckler et al., 2003; Andreoli et al., 2003; Joseph et al., 2002) aunque también se han localizado como autorreceptores en el caudoputamen (Joseph et al., 2002).

Mediante estudios de inmunohistoquímica, se ha podido comprobar que los receptores de tipo D4 se encuentran en baja concentración en el caudoputamen y de manera exclusiva en las neuronas de proyección estriadopalidales y estriadonigrales en las regiones de los estriosomas (pero no en las interneuronas) y en las dendritas, somas y neurópilos del núcleo accumbens (Rivera et al., 2002; Rivera et al., 2003).

Receptores dopaminérgicos en el Globo pálido

Los receptores dopaminérgicos que se han podido identificar en este núcleo son principalmente del tipo D2 en las terminales que proyectan del estriado (Gerfen et al., 1990; Florán et al., 1997; Cooper y Stanford, 2001). Existen evidencias de que los somas de las neuronas palidales inmunoreactivas para preproencefalina, que proyectan a las interneuronas GABAérgicas estriatales, poseen receptores de tipo D2 (Stefani et al., 2002; Hoover y Marshall, 2002; Billings y Marshall, 2003). Por otra parte, estudios recientes han podido establecer la expresión de receptores del tipo D4 en los somas de las neuronas de proyección palidales (Hernández et al., 2006).

Aún cuando no hay datos recientes, se han mostrado evidencias de receptores D1 posiblemente en las proyecciones colaterales de la vía gabaérgica estriadonigral (Florán et al., 1990).

Puesto que se conoce la existencia de una proyección dopaminérgica extraestriatal que se origina de la porción compacta de la sustancia nigra hacia el globo pálido, es de suponer que esta proyección mostrara receptores de tipo D2 en sus terminales, aunque hasta el momento, esto no ha podido demostrarse.

Receptores dopaminérgicos en el Núcleo Subtalámico

Aún cuando no se ha reportado expresión de RNAm para receptores dopaminérgicos D1 y D2 en este núcleo (Augood et al., 2000), mediante estudios autorradiográficos, se ha demostrado que la dopamina ejerce su efecto modulando la actividad neuronal en el núcleo subtalámico a través de receptores D1, D2 y D3 postsinápticos (Flores et al., 1999) aunque este punto es un tanto controversial ya que estudios recientes aseguran que esta actividad depende de receptores D2 únicamente pero no de tipo D1 (Zhu et al., 2002, Tofighy et al., 2003) como fue reportado por el grupo de Ni (2001) en donde inducen un aumento en la excitabilidad neuronal a través de la reducción de la conductancia al K⁺, (Zhu et al., 2002b), aunque en estudios electromiográficos en donde se relaciona al subtálamo con la regulación del tono muscular, se sabe que existen alrededor de 73% de receptores D1 y 66% de receptores D2 en este núcleo (Hemsley et al., 2002).

Por otra parte, mediante estudios de hibridización *in situ*, se ha podido identificar la presencia de RNAm para receptores de tipo D5 en las neuronas del subtálamo (Svenningsson y Le Moine, 2002), lo que se ha confirmado recientemente por el equipo de

Baufreton (2003) al comprobar mediante experimentos de fijación de voltaje en rebanas de cerebro de ratón, que la actividad de las neuronas con disparo en ráfaga, está controlada por receptores D5 a través de la modulación de la conductancia de canales de Ca²⁺ tipo L.

Receptores dopaminérgicos en la Sustancia nigra

Se sabe que en la porción reticulata de la sustancia nigra coinciden terminales GABAérgicas estriatales con receptores a dopamina tipo D1 (Walmsley et al., 1991; Yung et al., 1995; Rosales et al., 1997, Florán et al 1990), así como terminales subtalámicas con receptores D1 y D2 (Flores et al., 1999; Rosales et al., 1997, Ibañez-Sandoval et al 2006) y proyecciones dendríticas de la nigra compacta con receptores a dopamina de tipo D2 (Rosales et al., 1997) que, en su variante corta (D2S), constituyen aparentemente los principales autorreceptores dendríticos en la sustancia nigra (Centonze et al., 2002).

Recientemente, a través de registros electrofisiológicos se estableció que la dopamina modula la liberación de ácido glutámico en la sustancia nigra reticulata a través de la activación de receptores D1 y D2 en las terminales provenientes del núcleo subtalámico (Ibañez-Sandoval et al., 2006).

Si bien se ha sugerido que todas las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio muestran inmunorreactividad para receptores D3 (Diaz et al., 2000), su presencia en los somas de la porción compacta de la sustancia nigra, se encuentra actualmente en debate.

En cuanto al receptor D4, estudios de inmunocitoquímica han revelado su expresión en las terminales estriadonigrales (Rivera et al., 2003).

La investigación realizada hasta el momento se ha realizado a través de una variedad de modelos tanto *in vivo* como *in vitro* para describir el tipo, ubicación celular y subcelular, así como las funciones de los diferentes tipos de receptores dopaminérgicos. Sin embargo, la principal dificultad en la identificación de las variantes de estos receptores, se debe al alto porcentaje de homología en los constituyentes de su estructura, lo que hace necesaria la búsqueda de compuestos con una especificidad mucho más alta que los fármacos utilizados actualmente para poder describir con precisión el tipo de receptor así como la secuencia de eventos que modulan a nivel sináptico.

INTERACCIÓN DA-GABA EN LA SUSTANCIA NIGRA.

De acuerdo a la distribución de los receptores en las proyecciones que convergen en la sustancia nigra, se ha reportado que la liberación de GABA en este núcleo parece estar mediada por autorreceptores del tipo GABA A en la porción compacta y por autorreceptores del tipo GABA B en la porción reticulada (Florán et al., 1988), aunque a través de estudios de liberación de ^3H -GABA en sinaptosomas, se ha sugerido que este proceso ocurre en ambas porciones nigrales vía receptores GABA B (Giralt et al. 1990). Por otra parte, utilizando estudios de microdiálisis, se ha referido un efecto modulador en la liberación de GABA mediado por receptores D1 (Rosales et al, 1997; Matuszewich y Yamamoto, 1999; Trevitt, 2002), datos que concuerdan con los trabajos electrofisiológicos realizados por Radnikow y Misgeld (1998) y de liberación con neurotransmisores radiactivos (Florán et al., 1990). Adicionalmente, la liberación de GABA parece estar influenciada por la transmisión glutamatérgica a través de receptores metabotrópicos del grupo III (Wittman et al., 2002).

En cuanto a la modulación de la liberación de dopamina, estudios de microdiálisis han permitido sugerir que ésta ocurre mediante la participación de receptores del tipo D2 postsinápticos ubicados en las dendritas de la células dopaminérgicas de la SNc que proyectan al entorno de la sustancia nigra reticulada (Santiago y Westerink, 1991; Westerink et al., 1994). Por otra parte, se ha descrito también un efecto tónico inhibitorio GABAérgico en la liberación dendrítica de dopamina el cual es mediado aparentemente por receptores de tipo GABA A (Cobb y Abercrombie, 2002). Estos datos concuerdan con los obtenidos por voltametría pero tan solo para la porción compacta de la sustancia nigra ya que, adicionalmente, se describe un papel modulador por receptores de tipo GABA B en la liberación de DA en la porción reticulada (Balon et al., 2002). De igual modo, existen

algunas evidencias acerca del papel que tiene el glutamato como modulador de la liberación dopaminérgica. Estudios de microdiálisis han comprobado la participación glutamatérgica en este proceso en la sustancia nigra reticulada, ejerciendo su efecto sobre receptores ionotrópicos del tipo NMDA (Rosales et al., 1997) aunque es probable la participación de receptores del tipo AMPA los cuales también han sido descritos en las dendritas de la sustancia nigra compacta (Westerink et al., 1994). Estos datos se han visto reforzados recientemente con estudios de microdiálisis en los que se ha visto también la participación de receptores glutamatérgicos del tipo NMDA y no NMDA en la liberación de DA (Cobb y Abercrombie, 2002). Mediante inmunomarcaje y microscopía electrónica, se han identificado receptores para aminoácidos excitatorios en sinápsis asimétricas entre dendritas y botones en las porciones compacta y reticulada de la sustancia nigra (Chatha et al., 2000), dato que apoya la interacción entre estos neurotransmisores. Por último, estudios de microdiálisis han mostrado que el glutamato puede ejercer un efecto inhibitorio en la liberación de dopamina dendrítica a través de la activación de receptores glutamatérgicos metabotrópicos del grupo II (Campusano et al., 2002). La participación de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos en la liberación de DA también se ha hecho evidente por trabajos de electrofisiología en célula completa (Morikawa et al., 2003).

La liberación del glutamato en las terminales subtálamo-nigrales también se encuentra bajo el control del glutamato mismo. Este punto se ha hecho evidente a partir de experimentos de microdiálisis en los que los receptores glutamatérgicos metabotrópicos del grupo II y III producen una inhibición y activación respectivamente en la liberación de glutamato. La función de estos receptores es modulada aparentemente, por la dopamina en el entorno de la sinapsis subtálamo-nigral (Wittman et al., 2002). De manera más directa, se ha

reportado que la dopamina estimula la liberación de glutamato a partir de la activación de receptores D1 localizados presinápticamente mediante microdiálisis en sustancia nigra de rata, (Rosales et al., 1997), por registros extracelulares después de la aplicación iontoforética de dopamina (Ni et al., 2001), así como por receptores de tipo D2 (Abarca et al., 1995; Ibañez-Sandoval et al., 2006). Por otra parte, hallazgos recientes de nuestro laboratorio sugieren un efecto modulador directo de GABA, vía receptores GABA B, en la activación dopaminérgica de receptores D1 y D2 en las terminales subtálamo – nigrales.

A pesar de esta aparente abundancia de información sobre la acción de los neurotransmisores sobre receptores presinápticos, no ha podido elaborarse un esquema de interacción que explique las secuencias de activación y el efecto final sobre la actividad motora. La aproximación mas cercana en este respecto es el modelo propuesto por Rosales y colaboradores (1997) basado en hallazgos de microdiálisis; sin embargo, a la luz de los conocimientos actuales, es pertinente una reevaluación de estos datos. De acuerdo con su propuesta, la liberación de glutamato de las terminales subtalámicas estimula la liberación de dopamina de las proyecciones dendríticas de la SNc vía receptores NMDA, favoreciendo en consecuencia la liberación de GABA y glutamato a través de la activación de los receptores D1. Esta secuencia de activación hace que el sistema se retroalimente positivamente de tal manera que podría estar involucrado en la generación de algunas conductas motoras repetitivas.

No obstante, un elemento controversial en este modelo radica en que carece de explicación en cuanto al posible mecanismo que detenga el proceso así iniciado. Una alternativa interesante que aún no ha sido explorada, es que el mismo GABA, al alcanzar suficiente concentración, frene la salida de dopamina a través de la activación de los

receptores de tipo B y de esta manera detener el efecto de retroalimentación. Otra posibilidad, que es la que se plantea en este trabajo, implica la interacción entre los receptores GABAérgicos del tipo B y los receptores dopaminérgicos del tipo D1 los cuales coexisten en las terminales estriadonigrales. Por tanto, es de particular importancia el estudio de los eventos en la neurotransmisión alrededor de la sustancia nigra reticulata a fin de poder sugerir un rol específico para los receptores GABAérgicos del tipo B en la interacción dopamina-GABA-glutámico.

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA.

1. El control presináptico de la liberación de GABA en la sustancia nigra por receptores GABA B.

La búsqueda de alternativas farmacológicas para el tratamiento de las enfermedades del control motor como la enfermedad de Parkinson, ha llevado a proponer una gran variedad de estrategias basadas en el hecho de la coexistencia de receptores dopaminérgicos con otros sistemas de neurotransmisión, particularmente en los núcleos de salida como la sustancia nigra. Así, se han propuesto el uso de antagonistas de receptores para adenosina (Florán et al., 2002), para cannabinoides (Miller y Walker, 1995; Wallmichrath y Szabo, 2002) y para receptores glutamatérgicos metabotrópicos (Wittmann et al., 2001; Marino et al., 2001), además de agonistas para receptores histaminérgicos (García et al., 1997). La base para proponerlos es el efecto que producen sobre la liberación de GABA, pues se sabe que de esta depende el grado de activación/inactivación de los núcleos premotores talámicos y por lo tanto la corteza.

Sin embargo, poca atención se ha dado al control de la liberación de GABA por el mismo GABA y de este mecanismo como una alternativa para el tratamiento de este padecimiento motor. Así por ejemplo, se sabe desde hace tiempo que los receptores de GABA tipo B controlan la liberación de dopamina (Chen y Rice, 2002), por lo que se supuso que los fármacos con acción sobre estos receptores serían poco exitosos en el Parkinson, dado que esta enfermedad se origina precisamente por la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Recientemente, se ha mostrado que la distribución de estos receptores es más amplia (Charara et al., 2000; Ng y Yung, 2000) y que no solo se encuentran en las

dendritas/axones dopaminérgicos sino también en las aferentes estriado-nigrales (Florán et al., 1988; Giralt et al., 1990) y subtálamo-nigrales (Charara et al., 2004; Shen y Johnson, 2001), lo cual abre una nueva perspectiva en la investigación del uso de fármacos que activen a estos receptores con fines terapéuticos. Sin embargo, antes de ello, es importante conocer y entender bien su papel funcional y como regulan el tono GABAérgico en los núcleos de salida, como es el caso de la sustancia nigra.

Como se comentó anteriormente, la distribución de los receptores de GABA tipo B en los ganglios basales es amplia, y dentro de ellos el estriado y la sustancia nigra son los que tienen la mayor cantidad de ellos (Margeta-Mitrovic et al., 1999). Se han reportado receptores GABA B presinápticos en terminales GABAérgicas (Florán et al., 1988; Giralt et al., 1990) y glutamatérgicas (Charara et al., 2004; Shen y Johnson, 2001) de la sustancia nigra, en los componentes dendríticos de las neuronas de la sustancia nigra pars compacta (Charara et al., 2000) que proyectan a la región ventral de la sustancia nigra, así como en el soma de las neuronas nigrales GABAérgicas de proyección (Chan y Yung, 1999; ver Galván et al., 2006). En los tres primeros casos, estos receptores juegan aparentemente un papel crucial en el control presináptico de la SNr controlando la liberación de neurotransmisores, sin embargo, hasta el momento no ha sido posible demostrar que los receptores postsinápticos sean realmente funcionales o que contribuyan de manera significativa a los procesos de inhibición en estas neuronas de salida (Chan et al., 1998).

Dado que, como se comentó anteriormente, la inmunorreactividad para los receptores GABA B en la SNr es más densa en la región del neurópilo, se ha sugerido que estos receptores son probablemente extrasinápticos o que se localizan en regiones preterminales (Charara et al., 2004).

A pesar de estos hallazgos, su papel funcional no está del todo esclarecido, particularmente en lo que concierne a su participación en la liberación de GABA y su interacción con receptores dopaminérgicos presinápticos tipo D1 con los que coexiste (Florán et al., 1990). Inicialmente, se les asignó el rol de autorreceptor clásico, es decir que inhiben la liberación de GABA y mantienen el tono GABAérgico en el núcleo sin interactuar con otros receptores presinápticos de las terminales estriado-nigrales. Sin embargo este concepto se ha puesto en duda por observaciones como las de Misgeld (2004) en las que refiere cierta dependencia de la acción de receptores GABA B por receptores D1, por otro lado nuestro grupo de trabajo ha reportado que la acción inhibitoria de receptores de GABA B sobre la liberación de GABA en la sustancia nigra se pierde cuando no hay innervación dopaminérgica (Nava-Asbell et al., 2003). En conjunto, estos indicadores nos permiten considerar una dependencia del efecto de la dopamina por los receptores de GABA B. Dado que la acción de la dopamina en estas terminales esta mediada a través de receptores D1, es probable que exista una interacción entre ambos receptores que implique la activación de D1 por la dopamina. En este trabajo tratamos de estudiar si esto es cierto y a que nivel de la vía de señalización de los receptores D1, que facilitan la liberación de GABA, ocurre la interacción con los receptores GABA B, ya que sus vías efectoras intracelulares son opuestas pues mientras el primero estimula la actividad de la PKA, el otro la disminuye.

2. El control presináptico de la liberación de GABA en la sustancia nigra por receptores GABA A.

El efecto de la activación de los receptores de GABA A sobre el proceso de liberación de GABA, es menos conocido e incierto. Los datos de la literatura son contradictorios, pues aunque se ha descrito el papel de los receptores GABA A como

autorreceptores presinápticos que modulan la liberación de GABA (Arbilla et al., 1979) en el bulbo olfatorio (Panzanelli et al., 2004) e hipocampo (Jang et al., 2006), esto no ha podido ser demostrado en los ganglios basales donde, aún cuando es patente la expresión de receptores GABAérgicos del tipo A, estos han sido descritos como elementos eminentemente postinápticos o extrasinápticos dependiendo del tipo de subunidades que lo conformen (Möhler, 2006). Sin embargo, aunque se ha reportado un efecto de agonistas para receptores GABA A en la liberación de GABA en la pars compacta de la sustancia nigra (Florán et al., 1988), se desconoce si existe un efecto similar a nivel de la pars reticulata y menos aún si existe una interacción D1-GABA A a nivel presináptico como la sugerida en el soma de las neuronas estriado-nigrales (Flores-Hernández et al., 2000). En este trabajo también nos propusimos reevaluar el papel de los receptores GABA A en el control de la liberación GABA, y si existe o no una interacción con receptores a dopamina D1. Consideramos que una vez dilucidados estos aspectos se podrá hacer una mejor valoración del uso potencial de los fármacos con acción sobre estos receptores con fines terapéuticos, así mismo contribuir a entender mejor el papel funcional de los receptores de GABA en la sustancia nigra.

HIPÓTESIS

1. El efecto modulador en la liberación de [³H]-GABA en las terminales estriadonigrales por receptores GABA B, depende de la activación de los receptores dopaminérgicos del tipo D1, a través de una interferencia en la vía de señalización de estos últimos.
2. El efecto modulador en la liberación de [³H]-GABA en la sustancia nigra pars reticulata de los receptores GABA A, no depende de la activación de los receptores dopaminérgicos del tipo D1 ni interfiere con la vía de señalización de estos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Entender el papel de los receptores GABA A y B de la sustancia nigra sobre la liberación de GABA y su relación con los receptores D1 de las terminales estriado-nigrales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer el papel de los receptores de GABA B presinápticos en la liberación de ^3H -GABA en la sustancia nigra reticulata de la rata.
2. Estudiar la vía de señalización de los receptores D1 presinápticos que estimula la liberación de GABA en las terminales estriado-nigrales.
3. Estudiar la interacción presináptica del receptor dopaminérgico D1 y GABAérgico del tipo B en la sustancia nigra reticulata en la modulación de la liberación de GABA de las terminales estriado-nigrales.
4. Conocer el papel de los receptores de GABA A en la liberación de ^3H -GABA en la sustancia nigra reticulata de la rata.
5. Explorar si existe interacción entre receptores D1 y GABA A sobre la liberación de GABA.

METODOLOGIA

El modelo experimental empleado en este proyecto fue el de liberación de neurotransmisor marcado radioactivamente, de rebanadas de la sustancia negra reticulata (SNr) de rata. En este modelo, las rebanadas de tejido fueron incubadas previamente con el isótopo ácido γ amino butírico tritiado (^3H -GABA) y posteriormente se sometieron a superfusión continua con solución ringer a fin de valorar la concentración de neurotransmisor liberado (el cual fue medido por centelleometría) en diferentes circunstancias de activación y/o bloqueo de los receptores presentes en el sistema de neurotransmisión de cada núcleo. Las variaciones en estas mediciones, permitieron establecer inferencias en cuanto al tipo de receptores involucrados. A fin de determinar los cambios intracelulares derivados de la activación específica o simultánea de los receptores involucrados en el proceso de liberación de neurotransmisor, algunos experimentos fueron realizados con drogas que permitieron manipular la participación de algunos elementos en la vía de señalización.

Animales

Las rebanadas de cerebro de rata fueron obtenidas de ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de 180 - 220g las cuales fueron mantenidas en cajas compartidas (8 animales por caja) en condiciones de libre alimentación e ingesta de agua y con ciclos de iluminación – oscuridad de 12 x 12 horas hasta el momento del experimento. Los animales fueron tratados de acuerdo a las normas del Comité de Cuidado de Animales del CINVESTAV-IPN a fin de minimizar el sufrimiento y el número de los animales utilizados.

Preparación de rebanadas de cerebro

Las ratas fueron rápidamente sacrificadas por dislocación cervical. Una vez extraído, el cerebro fue colocado inmediatamente en inmersión en una solución de fluido cerebroespinal artificial (FCEA) frío (4 °C) y se obtuvieron rebanadas cerebrales sagitales de 300 µm de grosor mediante un vibrátomo. Las rebanadas que contenían a la sustancia nigra pars reticulata se colocaron en portaobjetos y bajo microscopio estereoscópico a fin de realizar la microdissección del núcleo el cual fue identificado de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1997). Una vez obtenidas, las rebanadas se incubaron por treinta minutos a temperatura ambiente en FCEA cuya composición fue (mM): NaCl, 118.25; KCl, 1.75; MgSO₄, 1; KH₂PO₄, 1.25; NHCO₃, 25; CaCl₂, 2; y D-Glucosa, 10, equilibrada continuamente con O₂/CO₂ (95:5, v/v). Las rebanadas se incubaron entonces durante treinta minutos con 8 nM de [³H]GABA en 2 ml de solución conteniendo 10 µM de ácido aminooxiacético con el propósito de inhibir la transaminasa de GABA y prevenir la degradación de GABA. Al final de este periodo, el exceso de marca radioactiva fue removido lavando dos veces con fluido cerebroespinal artificial conteniendo, además del ácido aminooxiacético 10µM de ácido nipecótico para prevenir la recaptura del [³H]GABA liberado. Ambos compuestos estuvieron presentes en la solución de perfusión durante el resto del experimento. Las soluciones libres de Ca²⁺ se prepararon sustituyendo todo el Ca²⁺ con Mg²⁺.

Estudios de liberación

Para medir la liberación de GABA las rebanadas fueron distribuidas aleatoriamente entre las cámaras (aproximadamente 4 rebanadas por cámara) en un sistema de superfusión que consta de 20 cámaras en paralelo y está compuesto de los siguientes elementos:

1. **Sistema regulador de temperatura** (Torrero de México) consistente en un baño de agua que mediante un sistema de resistencia y termostato mantiene a las soluciones de perfusión a una temperatura constante de 37 °C.
2. **Bomba de perfusión peristáltica** (Wattson Marlon 205 U) que impulsa las soluciones desde el baño térmico a las cámaras de perfusión que contienen las rebanadas a través de mangueras de neopreno.
3. **Cámara de perfusión.** Cada una de estas está formada por un cilindro de acrílico con un orificio interior que permite la entrada del medio de perfusión, una cámara interna con un túnel estrecho de 2.2 mm de diámetro por 10 mm de longitud, con una capacidad de 400 µl donde se coloca el tejido a perfundir y que se cierra con un tapón del mismo material sellado con un empaque de neopreno. La abertura inferior de la cámara se protege con discos de red de nylon para impedir la pérdida de tejido por el flujo del líquido de perfusión.
4. **Colector de fracciones** (LKB 2070 ULTRARACK II) que recibe las fracciones de perfusión en tubos de ensayo cada 4 minutos.

Las rebanadas fueron perfundidas con un flujo de FCEA a razón de 0.5 ml por minuto. La liberación basal de [³H] GABA se midió colectando 4 fracciones del perfusado (volumen total 2 ml) antes de despolarizar las rebanadas con una solución en la cual la concentración de K⁺ fue elevada a 20 mM. La composición de la solución de alto K⁺ fue (mM): NaCl, 101.25; NaCl, 18.75; MgSO₄, 1; KH₂PO₄, 1.25; NaHCO₃, 25; CaCl₂, 2; y D-

Glucosa, 10. Se colectaron entonces seis fracciones más en el medio de alto K^+ . Todas las drogas fueron añadidas al medio en la fracción 2, esto es, antes de cambiar el medio de superfusión a alto K^+ con el propósito de explorar algún efecto sobre la liberación basal. Para determinar la cantidad total de tritio remanente en el tejido, las rebanadas fueron recuperadas de las cámaras, se les añadió un mililitro de HCl 1m y se permitió su digestión durante una hora antes de añadir el líquido de centelleo.

Depleción de dopamina endógena por reserpina

Las ratas fueron pretratadas con reserpina administrada por vía subcutánea a razón de 10 mg / kg de peso 18 hrs antes de la preparación de las rebanadas. Los animales control fueron tratados con el mismo volumen (1 ml / kg) de vehículo (ácido láctico 7%). Este tratamiento provoca una caída en el contenido de dopamina en el estriado del 95% (García et al; 1997) lo cual muestra que es un tratamiento eficiente para depletar la dopamina endógena de los ganglios basales.

Drogas

Ácido aminooxiacético (AAOA), 8-bromoadenosina 3',5-monofosfato cíclico (8-Br-AMPC), ácido R (+)- β -(aminometil)-4-clorobenzenopropanoico hidroclicorido (baclofen), forscolina, ácido nipecótico, reserpina, N-[2-(p-bromo-cinnamilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89), R(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2-3-4-5-tetrahidro-1H-3-benzazepina hidroclicorida (SCH 23390), y R(+)-1-fenil-,3,4,5-tetrahidro-(1H)-3-benzazepina-7,8-diol hidroclicorida (SKF 38393) fueron obtenidos de SIGMA (St. Louis, MO, USA), ácido(RS)-3-amino-2-(4-clorofenil) propilsulfónico (saclofen) obtenido de Tocris Cookson Inc. (Ballwin, MO. USA), N-etilmaleimida, 3-hidroxi-5-aminoetilisoxasol hidrobromido (muscimol) [R-(R*,S*)]-6-(5,6,7,8-tetrahidro-6,6-dimetil-1,3-

dioxolo[4,5g]isoquinolin-5-yl)furo[3,4-e]-1,3-benzodioxolo-8(6H)-1 cloromonohidrato
(bicuculina).

Análisis de datos

La liberación de [³H] GABA se expresó inicialmente como la fracción de la cantidad total de tritio remanente en el tejido. El efecto de las drogas en la liberación basal de [³H] GABA fue valorado comparando la liberación fraccional en la fracción 2 (inmediatamente antes de la exposición del tejido a la droga) y la fracción 4 (inmediatamente antes de la exposición al K⁺ 20 mM), utilizando la prueba t pareada.

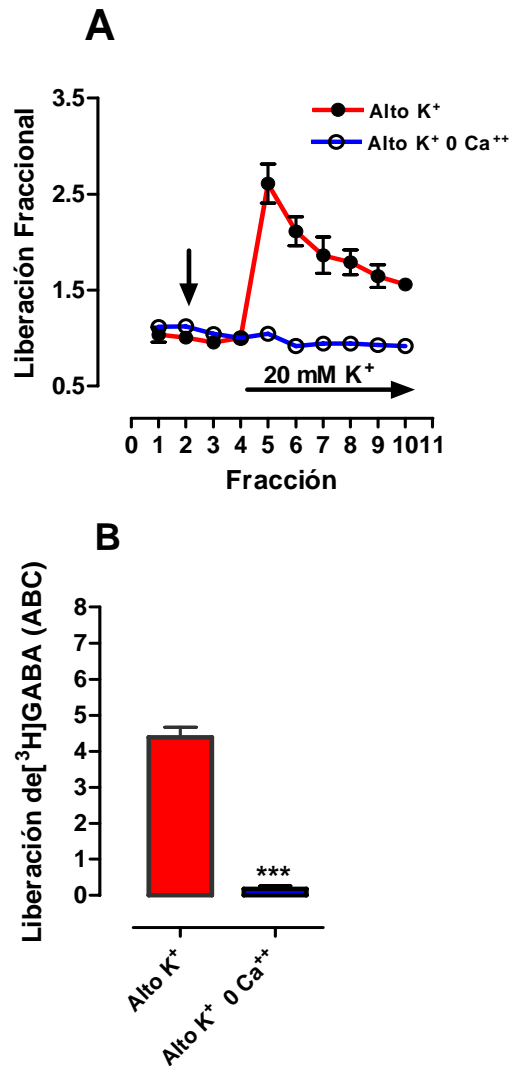
Los cambios producidos por las drogas y tratamientos en la liberación de [³H] GABA inducidos por la despolarización fueron valorados comparando el área bajo la curva de liberación entre la primera y última fracción colectada después del cambio a la solución de alto K⁺, haciendo la suposición de que la liberación basal de [³H] GABA permanecería sin cambio en el nivel medido en la fracción inmediatamente previa a la estimulación con K⁺. En trabajos realizados previamente en el laboratorio (García et al; 1997), se encontró que la caída en la liberación basal era menor del 1%. En experimentos en los cuales se valoró este dato la liberación basal en la fracción 10 fue de $97 \pm 2\%$ de la fracción 4, indicando un cambio mínimo en la liberación basal. La significancia de los efectos de la droga fue valorada por análisis de varianza de una vía seguido por pruebas múltiples de comparación post-hoc de Tukey-Kramer usando el programa PrismgraphPad 4.0, (GraphPad software, San Diego CA, USA). Para obtener una estimación sin sesgo de los valores de IC₅₀, los datos de dosis-efecto para la inversión de la estimulación de la liberación de [³H] GABA de SKF 38393 por baclofén los puntos fueron ajustados mediante regresión no lineal usando el mismo programa.

RESULTADOS

1. Dependencia del Ca^{++} extracelular de la liberación de [3H]-GABA.

Nuestros primeros experimentos fueron encaminados a conocer la dependencia del calcio extracelular de la liberación de GABA radiactivo de la sustancia nigra pars reticulata por dos razones: la primera con la idea de probar que la técnica utilizada en nuestros experimentos era adecuada para contar con una liberación exocitótica del neurotransmisor que mimetizara una liberación *cuasi* fisiológica y la segunda porque se ha propuesto que solo la liberación de neurotransmisores dependiente de Calcio (exocitótica) es modulable por receptores presinápticos.

En los experimentos de la gráfica 1-A se muestra que en nuestras condiciones experimentales la liberación de [3H]-GABA es altamente dependiente del ión calcio. La omisión de Ca^{++} y sustitución equimolar por Mg^{++} , produce que el estímulo despolarizante causara una disminución significativa de la liberación de hasta un $92\pm 2\%$, lo cual se puede visualizar con mayor claridad en la gráfica 1-B donde se representa el área bajo la curva de la gráfica de la sección A. El medio de perfusión sin Ca^{++} fue eliminado desde la fracción 2, es decir 8 minutos antes de la estimulación con K^+ , esta maniobra nos permite observar si la omisión del ión modifica o no la liberación basal. En esta situación nótese como la liberación basal es la misma en ambas condiciones, esto indica que solo la liberación estimulada por K^+ es dependiente de Ca^{++} .



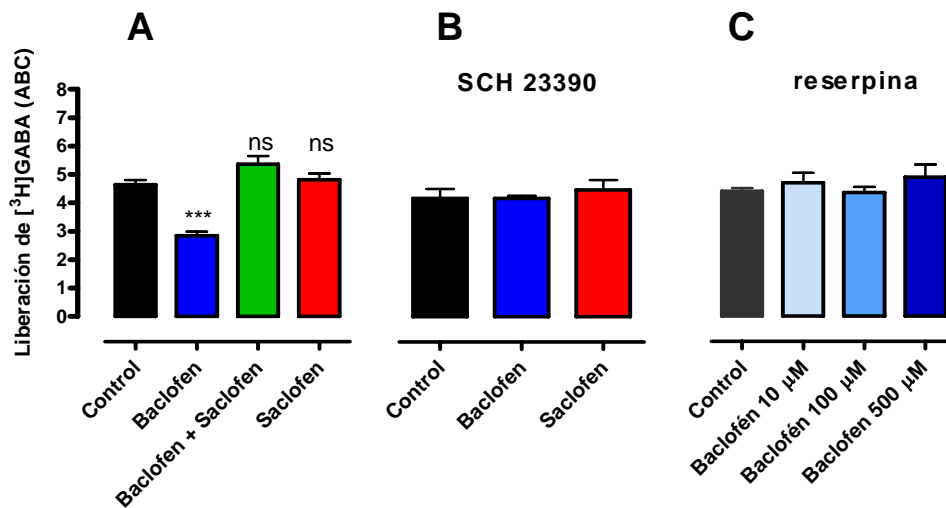
Gráfica 1. La liberación de GABA radioactivo por alto K⁺ depende de Calcio⁺⁺. La grafica muestra el efecto de la sustitución de Ca⁺⁺ por Mg⁺⁺ del medio de perfusión durante la estimulación con 20 mM de K⁺⁺. En A, se muestra el curso de la liberación fraccional en los dos grupos, el control y el experimental en el que se elimino el Calcio. La flecha horizontal muestra el momento en que se comenzó la perfusión con K y la vertical el momento en el que el calcio fue removido del medio de perfusión. Los valores representan el promedio ± error estándar de 3 experimentos (cinco replicas por experimento). En B se ilustra en barras el área bajo la curva de la gráfica en A. *** p<0.0001, t de Student para observaciones no pareadas. Note que la liberación basal no fue alterada por la omisión de Calcio (fracciones 3 y 4).

2. Efecto de la activación de receptores GABA B sobre la liberación de [³H]-GABA y su dependencia de dopamina.

Inicialmente probamos el efecto de la activación de los receptores de GABA tipo B con su agonista selectivo el baclofén (100 µM) sobre la liberación de GABA inducida por alto K⁺ en rebanadas de sustancia nigra de ratas normales. Los resultados se muestran en la gráfica 2-A en la cual, con fines didácticos, solo se muestran las áreas bajo la curva de las curvas de liberación correspondientes. El baclofén inhibió la liberación de GABA radiactivo

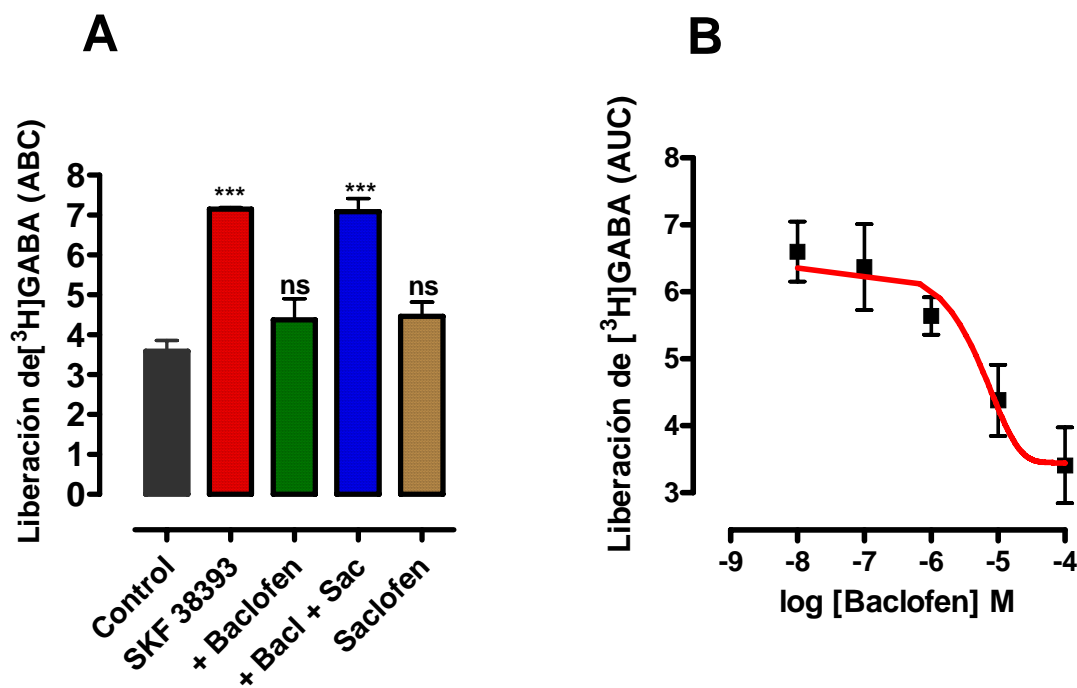
en un $48 \pm 8\%$ ($n = 3$ experimentos, 5 replicas por experimento; $p < 0.001$ con respecto del control). El saclofén ($1 \mu\text{M}$), que por sí mismo no tuvo un efecto, revirtió por completo el efecto del agonista.

Una vez conocido el efecto de la activación de los receptores de GABA tipo B sobre la liberación de GABA, procedimos a estudiar la dependencia a la dopamina y la activación de los receptores D1. Dado que nuestro grupo de trabajo ha mostrado que en estas condiciones la despolarización estimula la liberación de dopamina endógena y esta estimula la liberación de GABA a través de receptores D1 (Florán et al., 1990; Aceves et al., 1992), estudiamos los efectos de baclofén en dos condiciones. La primera, en rebanadas provenientes de ratas



Gráfica 2. El efecto del agonista selectivo para los receptores de GABA_B baclofén, depende la activación de receptores D1 por dopamina endógena. En A se muestra el efecto de la activación de los receptores de GABA tipo B por su agonista selectivo el baclofén ($100 \mu\text{M}$), sobre la liberación de GABA radioactivo inducida por K^+ en rebanadas de SNr provenientes de ratas normales. El efecto fue antagonizado por el saclofén ($1 \mu\text{M}$), el cual no tuvo efecto por si mismo. En B se muestra el efecto del bloqueo selectivo de los receptores D1 con su antagonista el SCH 23390 ($0.1 \mu\text{M}$) sobre el efecto del baclofén y saclofén en rebanadas provenientes de ratas normales. En C se muestra el efecto de diferentes concentraciones del baclofén sobre la liberación de GABA en rebanadas provenientes de ratas reserpinizadas (sin dopamina endógena). Nótese como en esta condición el baclofén no fue capaz de inhibir la liberación de GABA. Los valores representan el promedio \pm error estándar de 3 experimentos (cinco replicas en cada experimento). *** $P < 0.001$ con respecto de su control. ns: no significativo.

normales (sin reserpina), pero en presencia del bloqueo selectivo de los receptores D1 con el SCH 23390 (0.1 μ M) en el medio de perfusión. Como puede observarse en la gráfica 2-B en esta condición ni el baclofén, ni el saclofén produjeron efecto alguno sobre la liberación. La segunda condición consistió en la eliminación de dopamina endógena por medio de la reserpinización. Con esta maniobra, cuyos resultados se muestran en la figura 2-C, se puede apreciar que el baclofén no produce efecto alguno sobre la liberación en un rango de



Gráfica 3. El baclofén bloquea la estimulación de la liberación de GABA radiactivo estimulada por la activación de receptores D1 con SKF 38393. En A se muestra como el baclofén a concentración de 100 μ M bloquea por completo la estimulación de la liberación de GABA estimulada por el SKF 38393 (1 μ M) un agonista selectivo de los receptores D1; el efecto del baclofén fue prevenido por el saclofén (1 μ M) un antagonista selectivo de los receptores de GABA_B. En ausencia de la activación de receptores D1 el antagonista no mostró efecto alguno. Los experimentos se realizaron en rebanadas provenientes de ratas reserpinizadas para evitar efectos de dopamina endógena. Las barras representan el promedio \pm error estándar de tres experimentos con al menos tres replicas por experimento. *** P<0.001 con respecto del control. En B se muestra una curva dosis-respuesta del efecto del baclofén sobre el efecto del SKF 38393 (1 μ M). Los puntos representan el promedio \pm error estándar de cuatro determinaciones. La curva representa el mejor ajuste obtenida por regresión no lineal. La IC₅₀ calculada fue de 1 μ M con un

intervalo de confianza de 0.6 a 1.6 μ M. Estos experimentos también se realizaron en rebanadas de ratas reserpinizadas.

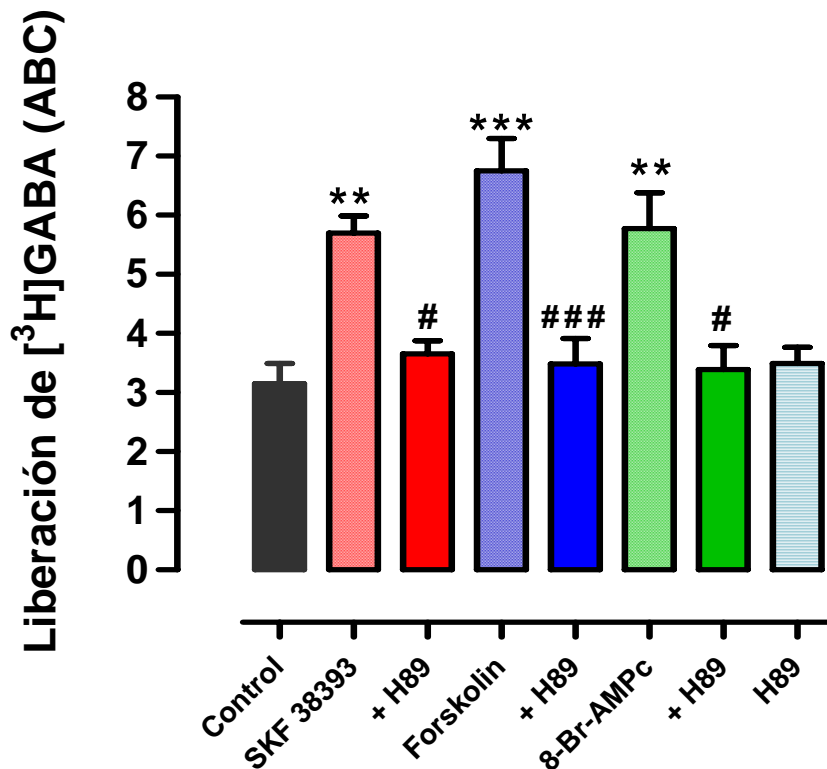
concentraciones que van de 10 a 500 μ M. Datos de nuestro laboratorio obtenidos por HPLC, han mostrado que este tratamiento con reserpina reduce hasta en un 92 \pm 4% el contenido de dopamina en la sustancia nigra de estas ratas (García et al., 1997).

Para entender mejor los efectos de la activación simultánea de los receptores de GABA B y los receptores D1, realizamos experimentos en donde activamos los receptores D1 con su agonista selectivo el SKF 38393 (1 μ M) y los receptores de GABA B con baclofén en rebanadas provenientes de ratas reserpinizadas. Los resultados se muestran en la figura 3-A. Nótese como el baclofén bloquea casi por completo el efecto estimulador del SKF 38393 sobre la liberación de GABA. El SKF 38393, como ha sido reportado por nuestro grupo de trabajo, estimula la liberación de GABA en estas condiciones en un 105 \pm 5% (Arias-Montaña et al., 2007). La sección 3-B muestra que el efecto una curva de dosis respuesta del baclofén sobre el efecto del SKF 38393 que da una IC₅₀ de 1 μ M con un intervalo de confianza de entre 0.6 a 1.6 μ M.

3. Efecto de los receptores de GABA tipo B sobre la vía de señalización de los receptores D1 que facilitan la liberación de GABA.

Los siguientes experimentos fueron diseñados para entender los mecanismos involucrados en la interacción entre receptores GABA B y D1 en el control de la liberación de GABA. Puesto que en el estriado los receptores D1 estimulan la liberación de GABA a través de la vía del AMPc-PKA, en esta ocasión probamos si ocurre un efecto similar a nivel de las terminales en la SNr.

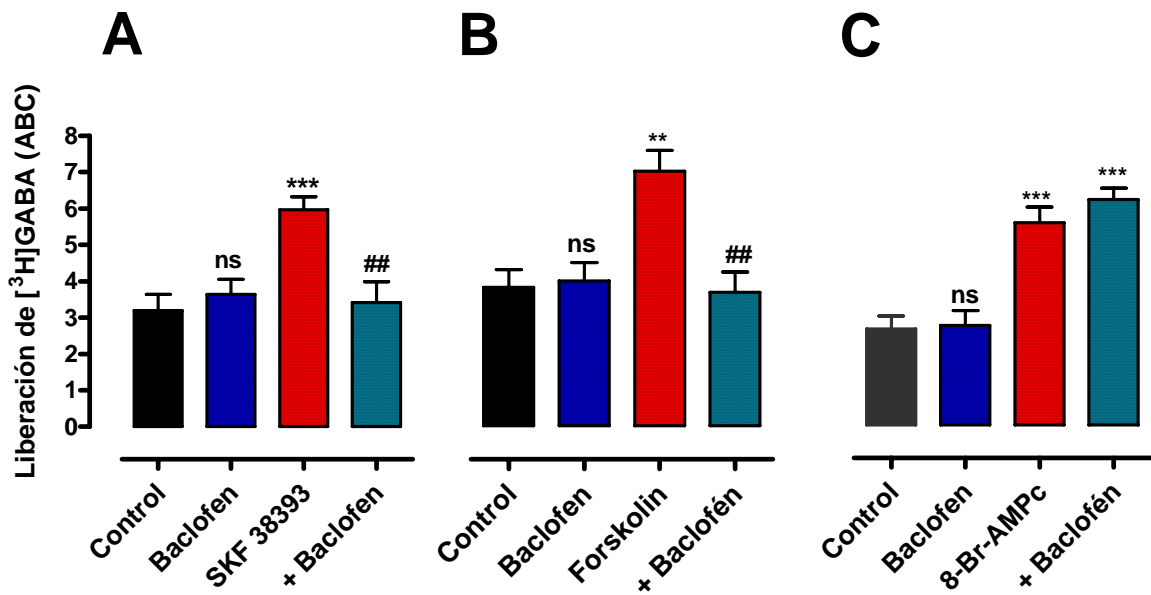
Se probaron tres maniobras, primero la estimulación del receptor D1 con su agonista selectivo el SKF 39393 (1 μ M), la activación de la adenilil ciclasa con forskolina (10 μ M) y la estimulación de PKA con el análogo no metabolizable del AMPc, el 8-Br-AMPc, las tres maniobras conllevan a la estimulación de la PKA y esta a estimular la liberación de GABA (Arias-Montaño et al., 2007). Los resultados de ellas se muestran en la grafica 4. Nótese



Gráfica 4. La estimulación de la liberación de GABA producida por la activación de receptores D1 es a través vía AMPc-PKA. La gráfica muestra el efecto estimulador sobre la liberación de GABA del SKF 38393 (1 μ M) un agonista selectivo de los receptores de dopamina D1, forskolina (10 μ M) una droga que estimula la formación de AMPc por la adenilil ciclasa y 8-Br-cAMPc (500 μ M) un activador de la PKA. Los efectos de las drogas fueron antagonizados por el inhibidor de la PKA H89 (10 μ M), el cual no tuvo efecto por si mismo. Las barras representan el resultado de tres experimentos por separado con al menos 3 replicas en cada observación. **P<0.01; *** P<0.001 con respecto del control; # P<0.05 con respecto del SKF 38393 o 8-Br-AMPC, ### p<0.001 con respecto de forskolina. Los experimentos se realizaron en rebanadas provenientes de ratas reserpinizadas.

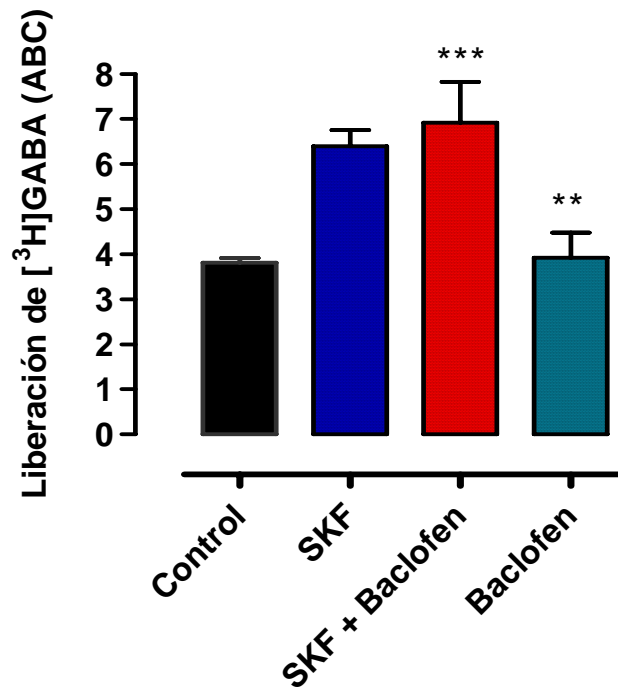
como los tres compuestos estimulan la liberación de GABA. En la misma gráfica se muestra que el bloqueo selectivo de la PKA con H89 (10 μ M), previno el efecto de las tres maniobras sin tener efecto por sí mismo.

Una vez caracterizada la vía de estimulación de la liberación por receptores D1, procedimos a estudiar el nivel de interacción de los receptores de GABA B con esta vía. Los resultados se muestran en las gráficas 5-A, B y C. En ellas se muestra como el baclofén bloquea los efectos de SKF 38393 y la forskolina al igual que el H89, pero no el del 8-Br-AMPC.



Gráfica 5. El baclofén bloquea la estimulación de la liberación de GABA, por el SKF 38393 y la forskolina, pero no la estimulada por 8-Br-AMPC. En A se muestra el efecto del baclofén (100 μ M) sobre la estimulación de la liberación de GABA estimulada por la activación de los receptores D1 con SKF 38393 (1 μ M). En B se muestra en mismo efecto, pero en este caso la liberación se estimuló con Forskolinaa (10 μ M) un agente que estimula directamente la adenilil ciclasa y en C, la estimulación de la PKA con 8-Br-AMPC (500 μ M). Notese la falta de efecto del baclofén sobre este último. Las barras representan el resultado de tres experimentos por separado con al menos 3 replicas en cada observación. **P<0.01; *** P<0.001 con respecto del control; ## P<0.01 con respecto del SKF 38393 o Forskolinaa. Los experimentos se realizaron en rebanadas provenientes de ratas reserpinizadas.

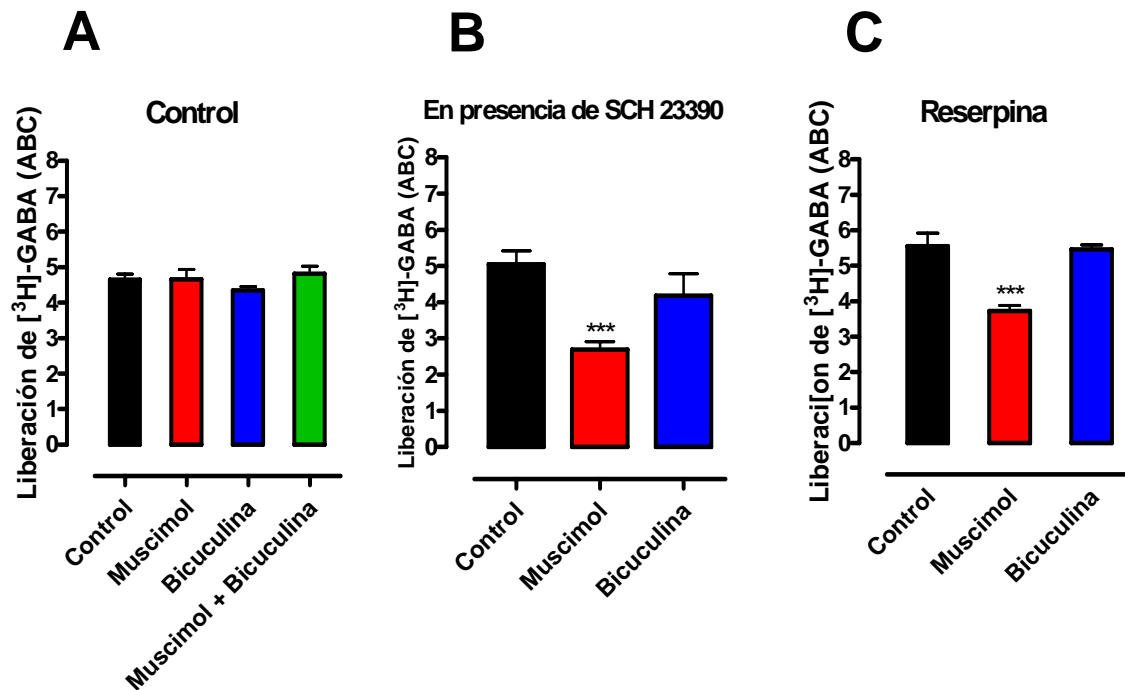
Dado que los receptores GABA B pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G_i , la participación de las mismas en el bloqueo de la estimulación de la liberación estimulada por receptores D1, se hizo a través del uso del agente alquilante de grupos sulfhidrilo N-etil-maleimida (NEM), que se conoce bloquea los efectos de receptores acoplados a proteínas $G_{\alpha i}$ sensibles de toxina pertusis. El NEM (300 μ M), inhibió el efecto del baclofén sobre el efecto del SKF 38393. En tanto que por si solo no produjo ningún efecto. Los resultados se muestran en la gráfica 6.



Gráfica 6. La inactivación de la proteína $G_{\alpha i/o}$ con N-étil-maleimida (NEM) inhibe el efecto del baclofén sobre la liberación de GABA estimulada por receptores D1. La aplicación del NEM (300 μ M) abolió el efecto inhibitorio del baclofén sobre la liberación de GABA estimulada por el SKF 38393 (1 μ M). En esta condición el baclofén por sí mismo no modificó la liberación. Las barras representan el resultado de tres experimentos por separado con al menos 3 replicas en cada observación. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ con respecto del control. Los experimentos se realizaron en rebanadas provenientes de ratas reserpinizadas.

4. Efecto de la activación de receptores GABA A sobre la liberación de [³H]-GABA y su interacción con los receptores D1.

En estos experimentos probamos el efecto de la activación de los receptores de GABA tipo A con su agonista selectivo el muscimol (100 μM) sobre la liberación de GABA



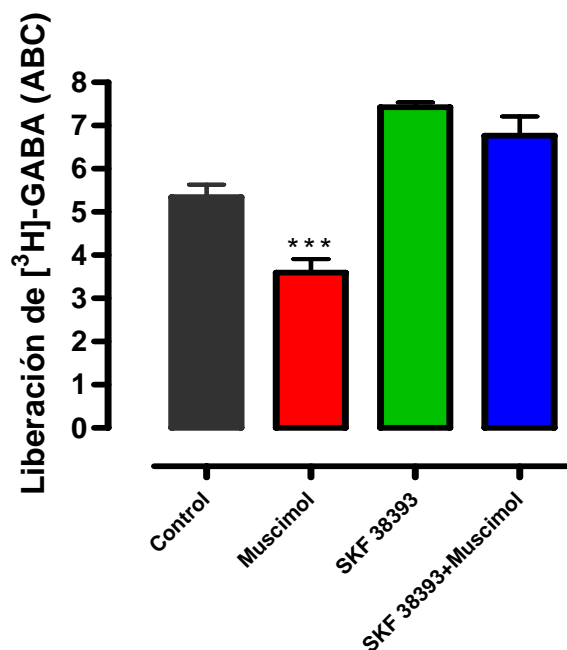
Gráfica 7. Efecto del agonista selectivo para los receptores de GABA_A muscimol sobre la liberación de GABA se ve enmascarado por la activación de receptores D1 por dopamina endógena. En A se muestra el efecto de la activación de los receptores de GABA tipo A por su agonista selectivo el muscimol (100 μM), sobre la liberación de GABA radioactivo inducida por K⁺ en rebanadas de SNr provenientes de ratas normales. El efecto fue antagonizada por la bicuculina (1 μM), el cual no tuvo efecto por sí misma. En B se muestra el efecto del bloqueo selectivo de los receptores D1 con su antagonista el SCH 23390 (0.1 μM) sobre el efecto del muscimol y la bicuculina en rebanadas provenientes de ratas normales. En C se muestra el efecto del muscimol sobre la liberación de GABA en rebanadas provenientes de ratas reserpinizadas (sin dopamina endógena). Nótese como en estas dos últimas condiciones el muscimol fue capaz de inhibir la liberación de GABA. Los valores representan el promedio ± error estándar de 3 experimentos (cinco replicas en cada experimento). *** P<0.001 con respecto de su control.

inducida por alto K^+ en rebanadas de sustancia nigra de ratas normales. Los resultados se muestran en la gráfica 7-A, en la cual con fines didácticos solo se muestran las áreas bajo la curva de las curvas de liberación correspondientes. El muscimol por sí solo no modificó la liberación de GABA radiactivo. La bicuculina ($1\mu\text{M}$) tampoco modificó la liberación de GABA inducida por el alto K^+ .

Para explorar la existencia de alguna interacción de los receptores GABA A con los receptores a dopamina, estudiamos los efectos del muscimol bloqueando los receptores D1 con SCH 23390 ($0.1\ \mu\text{M}$) o eliminando la dopamina endógena por medio de la estrategia de reserpinización, similar a la efectuada con los receptores de GABA tipo B.

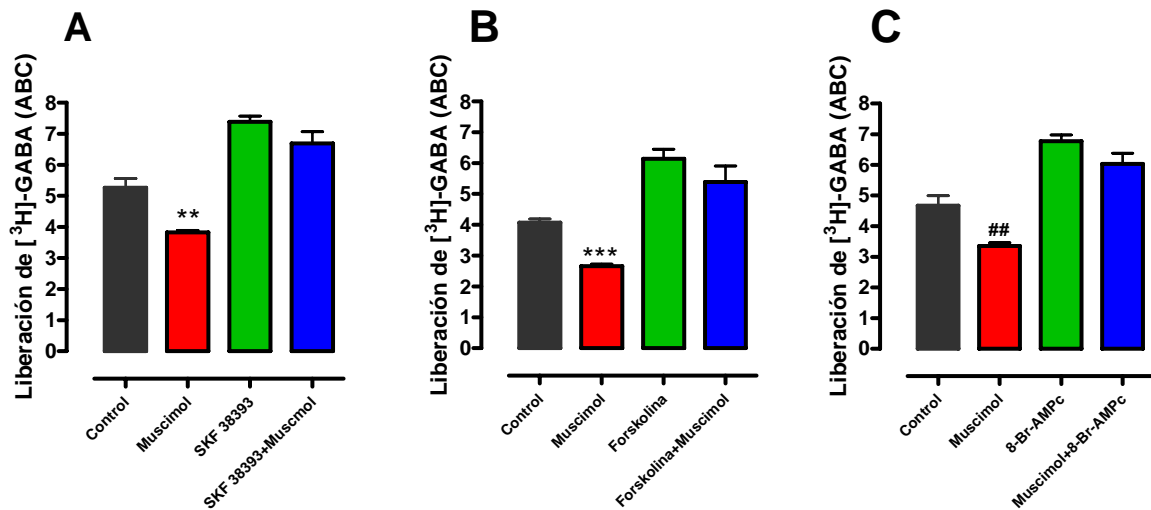
La primera maniobra en rebanadas provenientes de ratas normales, pero en presencia de bloqueo selectivo de los receptores D1 con el SCH 23390 ($0.1\ \mu\text{M}$) en el medio de perfusión, mostró que el muscimol inhibió de manera significativa la liberación de GABA, como puede observarse en la gráfica 7-B y que la bicuculina no mostró ningún efecto. La segunda condición (la eliminación de dopamina endógena por medio de la reserpinización). Cuyos resultados se muestran en la figura 7-C muestran que se mimetizó el efecto del muscimol sobre la liberación de GABA.

Para entender mejor los efectos de la activación de los receptores de GABA A y los receptores D1, realizamos experimentos en donde activamos los receptores D1 con su agonista selectivo el SKF 38393 ($1\mu\text{M}$) y los receptores de GABA A con muscimol en rebanadas provenientes de ratas reserpinizadas. Los resultados se muestran en la gráfica 8. Nótese como el muscimol no bloquea el efecto del SKF 38393 sobre la liberación, pero si se administra sin activar al receptor D1, es capaz de inhibir la liberación.



Gráfica 8. El muscimol no modifica la estimulación de la liberación de GABA radiactivo estimulada por la activación de receptores D1 con SKF 38393. En A se muestra como el muscimol a concentración de 10 μ M no bloquea la estimulación de la liberación de GABA estimulada por el SKF 38393 (1 μ M) un agonista selectivo de los receptores D1. En ausencia de la activación de receptores D1 el agonista por si mismo inhibe la liberación de GABA. Los experimentos se realizaron en rebanadas provenientes de ratas reserpinizadas para evitar efectos de dopamina endógena. Las barras representan el promedio \pm error estándar de tres experimentos con al menos tres replicas por experimento. *** P<0.001 con respecto del control.

La probable interacción de los receptores de GABA A con los receptores D1 y su vía de señalización se estudió una vez caracterizada la vía de estimulación de la liberación por receptores D1 como se procedió con el baclofén y los receptores GABA B. Los resultados se muestran en las gráficas 9-A, B y C. En ellas se muestra como el muscimol no bloquea los efectos del SKF 38393 (1 μ M), la forskolina (10 μ M) ni del 8-Br-AMPC (500 μ M).



Gráfica 9. El muscimol no bloquea la estimulación de la liberación de GABA, por el SKF 38393, forskolina, ni la estimulada por 8-Br-AMPC. En A se muestra el efecto del muscimol (10 μ M) sobre la estimulación de la liberación de GABA estimulada por la activación de los receptores D1 con SKF 38393 (1 μ M). En B se muestra en mismo efecto, pero en este caso la liberación se estimuló con forskolina (10 μ M) un agente que estimula directamente la adenilil ciclasa y en C, la estimulación de la PKA con 8-Br-AMPC (500 μ M). Nótese la falta de efecto del muscimol sobre estas maniobras relacionadas con la activación de receptores D1. Las barras representan el resultado de tres experimentos por separado con al menos 3 réplicas en cada observación. **P<0.01; *** P<0.001 con respecto del control; ## P<0.01 con respecto del SKF 38393 o forskolina. Los experimentos se realizaron en rebanadas provenientes de ratas reserpinizadas.

DISCUSION

1. El mecanismo y origen de la liberación de [³H]-GABA en la sustancia nigra.

Durante mucho tiempo se ha cuestionado el origen del GABA radioactivo liberado por despolarización con alto K^+ (Bernath, 1992). Este pudiera provenir tanto de terminales GABAérgicas como de células gliales que tienen la capacidad de capturarlo, metabolizarlo y eventualmente liberarlo por aumento de K^+ extracelular, lo cual bien pudiera ocurrir en nuestro sistema (Albrecht et al., 1988). Sin embargo, aparentemente la liberación glial de GABA es Ca^{++} independiente y se produce sobre niveles de despolarización de más de 50 mM de K^+ (Bernath, 1992), lo cual no ocurre en nuestra preparación como se desprende de los métodos (despolarización con 20 mM de K^+) y los controles mostrados en las gráficas 1, A y B. De manera interesante, el porcentaje de dependencia de Ca^{++} de la liberación es alto, lo que indica un origen neuronal importante de la marca colectada muy probablemente a través de exocitosis (Limberger et al., 1986). Otros aspectos relacionados con la liberación, como el metabolismo del [³H]- GABA, son prevenidos en nuestro sistema por la adición de bloqueadores de la GABA transaminasa, (GAT enzima que degrada el GABA) como el ácido amino-oxi-ácético (Starr, 1975). Con respecto a una posible recaptura de la marca, el flujo de perfusión y la adición de ácido nipecótico al medio de perfusión (Krogsgaard-Larsen y Johnston, 1975), evita la reincorporación del GABA radioactivo a elementos tanto neuronales como gliales, lo cual contribuye a asegurar que la marca colectada no sea un metabolito del GABA, aumentando además la señal radioactiva. Datos de nuestro grupo de trabajo (no mostrados), en los cuales se determinó por cromatografía de capa fina el GABA de las muestras de perfusión, mostraron que aproximadamente entre un 85-90% de la marca corresponde a GABA.

Por otro lado nuestro grupo de trabajo, también ha mostrado que la activación de receptores D1 que facilitan la liberación de GABA ocurre solo cuando la preparación es perfundida con una alta concentración de K^+ y no sobre la liberación espontánea o basal (Aceves et al., 1992), esto indica que los efectos mostrados por la activación de los receptores estudiados modifica algún paso en el proceso durante la liberación del neurotransmisor. En resumen, consideramos que contamos con una preparación adecuada que monitorea la liberación de GABA proveniente de terminales GABAérgicas en la sustancia nigra. Los efectos de la activación de receptores presinápticos sobre la liberación de GABA, como los aquí estudiados con esta técnica han sido publicados y reproducidos en otros estudios como los electrofisiológicos (Shen y Johnson, 1997; Chan et al., 1998; Chan y Yung, 1999) y de microdiálisis (Rosales et al 1997; Trevitt et al., 2002).

Existen al menos dos aferencias y una fuente local de liberación de GABA en la sustancia nigra reticulata. La primera es la estriado-nigral (Szabo, 1977; Gerfen, 1985), la segunda es la palido-nigral (Grofova, 1975) y la fuente local corresponde a interneuronas y axones recurrentes (Grace y Bunney, 1985; Lee y Tepper, 2007). La fuente más probable de GABA medido en nuestras condiciones sería la que proviene de las aferentes estriatales y pálidas, ya que de acuerdo a la literatura el 60-80% del GABA provendría de ellas (Lantin le Boulch, 1991), pero como veremos más adelante la porción remanente dada por interneuronas es también importante en la interpretación de nuestros resultados. Por otro lado, los receptores D1 aparentemente están localizados en las aferentes estriatales de acuerdo a la hipótesis de la segregación (Rosales et al., 1997, Florán et al 1990) y sería sobre ellas donde una parte de nuestras observaciones ocurrirían.

2. Modulación de la facilitación de la liberación de [³H]-GABA mediada por receptores D1.

La inhibición de la liberación de GABA mediada por receptores GABA B y estudiada en nuestro caso a través de la activación selectiva con su agonista el baclofén, requiere por un lado de dopamina endógena y por el otro de la activación de los receptores D1 como se muestra en las gráficas 2 y 3. En nuestras condiciones experimentales el baclofén no puede inhibir la liberación de GABA por sí mismo, si la activación del receptor D1 no ocurre, ya sea por dopamina endógena (grafica 2B y 2C) o la adición de su agonista el SKF38393 (grafica 3). Es interesante ver que esta dependencia del efecto del baclofén es tan importante que incluso a concentraciones hasta de 500 μM no modifica la liberación *per se* en rebanadas de ratas reserpinizadas; concentraciones que están muy por encima de la IC_{50} estimada por nuestro grupo de trabajo y datos de la literatura: 0.60 μM (Shen y Johnson 1997); 5 μM (Florán et al 1988) así como también la encontrada en este trabajo (grafica 3B) que fue de 3.6 μM .

La causa de esta falta de efecto, esta por aclararse y requiere de mayor estudio experimental, sin embargo hay que tomar en cuenta que diversos reportes sugieren una dependencia del receptor GABA B a la activación del D1 (Shen y Johnson, 1997, Misgeld 2004, Nava-Asbell 2003); como se muestra en el trabajo de Radnikow y Misgeld de 1998, en donde el bloqueo de los receptores D1 con SCH 23390 produce una reducción drástica de las corrientes inhibitorias post-sinápticas evocadas por estimulación local. En nuestro caso la estimulación con alto K^+ , también puede evocar la liberación de dopamina endógena y la activación de receptores D1 (Aceves et al 1995). Efectos similares a este, también los hemos visto en casos de otros receptores presinápticos que colocalizan con los receptores D1 de

estas terminales, tal es el caso de los receptores H3 (García et al 1977) y los receptores A1 (Florán et al 2002), y los receptores a cannabinoides CB1 (datos no publicados). Esto parece indicar que los efectos sobre la liberación de GABA por heterreceptores en las terminales estriado-nigrales, requiere de la activación previa de receptores D1.

3. Vía de señalización de los receptores D1 y el mecanismo de acción de los receptores GABA B.

La estimulación de la liberación de GABA en el estriado por receptores D1 sigue la vía de señalización del AMPc-PKA (Arias-Montaña 2007), en las terminales nigrales este también es el mecanismo a juzgar por los datos de la gráfica 4. A nivel de las terminales estriatales (muy probablemente las recurrentes colaterales) el canal de calcio involucrado es de tipo P/Q, por lo que es muy probable que a nivel de las terminales estriado-nigrales también ocurra, aunque no los exploramos en nuestros experimentos.

Los receptores de GABA tipo B inhiben la liberación de GABA antes de la formación de AMPc a juzgar por los resultados de la gráfica 5, lo que sugiere que el nivel de la interacción D1-GABA B ocurre en los primeros pasos de la vía de señalización; bien en el acople receptor-proteína G o a nivel de la adenilil ciclasa. En la primera posibilidad, pudiera ocurrir una interacción proteína-proteína entre ambos receptores, por ello realizamos experimentos en los que se bloqueo el acople de los receptores de GABA tipo B con las proteínas Gi, usando N-étil-maleimida, un agente alquilante de proteínas Gi sensibles de toxina pertusis (Shapiro et al., 1994). Esto resultó en una pérdida del efecto inhibitorio del baclofén, en tanto que se mantuvo el efecto del SKF 38393, lo cual habla en contra de una interacción de este tipo; por otro lado, no hemos encontrado en la literatura reportes de

interacciones de este tipo entre estos receptores. La segunda posibilidad es que el efecto antagónico ocurra a nivel de la adenilil ciclasa, esto es más factible dado que es bien conocido que los receptores GABA B están acoplados a proteínas G_i , las cuales producen inhibición de la adenilil ciclasa. El mecanismo antagónico sugiere que al activarse el receptor D1 por la dopamina, su natural acople a proteínas G_{olf} estimula la adenilil ciclasa, formación de AMPc y activación de la PKA, en esta condición la activación de proteínas G_i por el GABA B contrarresta el efecto del D1, lo cual se traduce en una inhibición de la liberación de GABA previamente estimulada, de lo cual surge la dependencia de dopamina y la activación de receptores D1 observadas.

Otras explicaciones probables del efecto inhibitorio de los receptores GABA B sobre la liberación de GABA, pudieran ser que la subunidad $\beta\gamma$ de las proteínas G_i activadas inhiba al canal de calcio implicado en la liberación (Delmas et al., 2005), este caso no parece ser responsable en nuestros experimentos dado que implicaría un efecto *per se* del baclofén sin necesidad de activación de receptores D1.

Por último cabe mencionar si los receptores de GABA B de la sustancia nigra deben ser vistos como autorreceptores clásicos o moduladores presinápticos. Algunos investigadores consideran que un autorreceptor en el concepto clásico inhibe la liberación del neurotransmisor *per se*, ayudando a controlar la liberación evocada por el potencial de acción (Giralt et al., 1990; Chan y Yung, 1999; Paladini et al., 1999). Si es así los autorreceptores de GABA tipo B no requerirían de la activación de receptores D1. Este no sería nuestro caso, sino que el comportamiento del receptor de GABA B sería más bien de tipo moderador, como ha sido sugerido por Misgeld (2004).

4. Modulación de la liberación de [³H]-GABA por receptores tipo A.

La activación de receptores de GABA A también inhibe la liberación de GABA en la sustancia nigra pars reticulata (gráficas 7B y 7C), este efecto por el contrario de lo que ocurre con los receptores de GABA tipo B, se ve enmascarado por la presencia de dopamina y la consecuente activación de receptores D1, como se ve en la grafica 7A. El enmascaramiento pudiera ocurrir debido al exceso de GABA que provoca en el sistema la estimulación de receptores D1, como discutimos en la sección anterior. Así la adición al medio de muscimol no modifica la liberación al encontrar un buen número de receptores ocupados inclusive a concentraciones tan altas del agonista como las usadas en este trabajo (100 μ M). Debido a ello en reportes previos no pudimos mostrar el efecto del muscimol sobre la liberación de GABA en la sustancia nigra pars reticulata (Florán et al 1988), en donde la dosis empleada fue de 1 μ M. Otros estudios como los de Arbilla et al (1979), muestran un disminución de la liberación de GABA por muscimol a pesar de que en su sistema pudiera haber liberación de dopamina endógena, particularmente a las concentraciones de K^+ utilizada por estos autores (30 mM). Probablemente las diferencias experimentales entre nuestro trabajo y el de ellos puedan ser la causa de la controversia, tales como la concentración de K^+ utilizadas, la no separación de la pars compacta de la pars reticulata etc.

La siguiente pregunta sería tratar de entender si el mecanismo de inhibición está ligado a la activación de receptores D1. En el estriado los receptores GABA A y D1 interactúan a nivel del soma, así Flores-Hernández et al (2000), encontraron que la activación de receptores D1 atenúa las corrientes de cloro provocadas por la activación de receptores GABA A a través de la vía PKA-DARPP-32-PP1. Una interacción similar pudiera ocurrir a nivel de las terminales en la sustancia nigra que explicaría los efectos

observados. Lo cual se ve apoyado por los resultados de las gráficas 8 y 9, en las que se observa que el muscimol no interfiere con los efectos de la activación del D1 y su vía de señalización. De hecho la falta del efecto del muscimol sobre la liberación estimulada por 8-Br-AMPC y forskolina, sugiere que cualquier maniobra que estimule la liberación de GABA enmascara el efecto del muscimol. Sin embargo esta explicación pudiera no ser factible, dado que los estudios de localización de los receptores GABA tipo A basados en inmunohistoquímica sugieren que la localización de estos y sus subunidades en la sustancia nigra reticulata es post-sináptica (Chan y Yung, 1999; Paladini et al., 1999; Waldvogel et al., 2004), en tanto que los receptores D1 son eminentemente presinápticos (Barone et al., 1987; Misgeld, 2004).

Una alternativa más plausible puede radicar en el origen del GABA que esta siendo modulado. Las fuentes reconocidas de GABA en la sustancia nigra reticulata son: las aferentes estriatales y palidales (Paladini et al., 1999), las recurrentes colaterales de las neuronas de proyección (Lee y Tepper, 2007) y las interneuronas GABAérgicas (Grace y Bunney, 1985). Los receptores de GABA tipo A se localizan en las neuronas de proyección y las interneuronas, en consecuencia el GABA radiactivo proveniente de estas durante el disparo neuronal provocado por la despolarización, se vería disminuido al activar el receptor tipo A por el muscimol. En el caso de activación del receptor D1 el nivel de GABA, sería elevado tal que el efecto del muscimol estaría enmascarado como se comento anteriormente y que se apoya en el resultado de la gráfica 7-B en donde en ratas normales el bloqueo de los receptores D1 con SCH 23390 también desenmascara el efecto del muscimol.

En resumen el efecto de los receptores de GABA tipo A en la sustancia nigra, esta enmascarado por la activación de receptores D1 y parece localizarse sobre receptores localizados a nivel post-sináptico.

5. Implicaciones funcionales y farmacológicas.

La modulación de los receptores de GABA B del efecto facilitatorio de la liberación dada por receptores D1 puede ser relevante para el control de la actividad de las neuronas nigrales de proyección. La activación del receptor D1 produce inhibición de las neuronas de salida que promueve la locomoción por desinhibición de los núcleos premotores del tálamo (Yurek y Hipkens 1993). Por otro lado, la inhibición de las interneuronas nigrales, vía colaterales (Tepper et al 1995), desinhibiría las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta, lo que incrementaría la liberación de dopamina en el estriado (Balon et al 2002). Este incremento en la dopamina estriatal estimularía la actividad de las neuronas estriatales de proyección e incrementaría más la locomoción. Así mismo a nivel local, como ha sugerido Rosales et al (1997), la liberación de dopamina dendrítica y activación de receptores D1 estimularía la liberación de GABA y de glutamato de manera directa, el glutamato a su vez estimula también la liberación de dopamina vía receptores NMDA, en circuito recurrente que estaría involucrado en conductas repetitivas por activación de receptores D1. Una vez que la concentración de GABA aumentara en estas tres condiciones, la activación de receptores GABA B, se opondría a los efectos de la dopamina al controlar la actividad de los receptores D1 presentes en las terminales estriado-nigrales (Aceves et al., 1991), y al inhibir la liberación dendrítica de dopamina (García et al 1997), y controlando así su acción sobre la locomoción.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación, nos sugieren que la activación de los receptores GABA B en las terminales estriadopalidales de la sustancia nigra pars reticulata inhiben la liberación de [³H]-GABA facilitada por la activación de los receptores dopaminérgicos del tipo D1, interfiriendo en la vía de señalización a nivel de la adenililciclase.

Por otra parte, la activación de los receptores GABA A induce una inhibición en la liberación de [³H]-GABA, aunque este efecto no se observa durante la activación de los receptores D1. Aunque la localización exacta del control presináptico de la liberación de [³H]-GABA por receptores GABA A requiere de estudios adicionales, este puede ocurrir probablemente a nivel de las interneuronas nigrales.

El control de la facilitación en la liberación de GABA de las terminales estriado-nigrales por los receptores presinápticos D1 a través de la activación de los receptores GABA B, adquiere especial importancia en la enfermedad de Parkinson pues el tratamiento crónico con L-dopa y su subsecuente conversión a dopamina ejercería una activación sostenida ante la elevada expresión de los receptores D1 que se sabe ocurre como respuesta a la muerte neuronal dopaminérgica lo cual derivaría en la inhibición de las neuronas de proyección de la pars reticulata de la sustancia nigra, iniciando probablemente episodios de discinesias característicos del tratamiento con L-dopa. Así, los resultados obtenidos en este proyecto sugieren la posibilidad de emplear agonistas para los receptores GABA B, de manera conjunta al tratamiento clásico de la enfermedad del Parkinson.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, J.; Gysling, K.; Roth, R. H., and Bustos, G. Changes in extracellular levels of glutamate and aspartate in rat substantia nigra induced by dopamine receptor ligands: *in vivo* microdialysis studies. *Neurochem Res.* 1995 Feb; 20(2):159-69.
- Aceves, J.; Florán, B.; Martínez-Fong, D.; Benitez, J.; Sierra, A., and Flores, G. Activation of D1 receptors stimulates accumulation of gamma-aminobutyric acid in slices of the pars reticulata of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurosci Lett.* 1992 Sep 28; 145(1):40-2.
- Aceves, J.; Florán, B.; Martínez-Fong, D.; Sierra, A.; Hernández, S., and Mariscal, S. L-dopa stimulates the release of. *Neurosci Lett.* 1991 Jan 2; 121(1-2):223-6.
Notes: gamma-aminobutyric acid in the basal ganglia of 6-hydroxydopamine lesioned rats
- Aceves, J.; Florán, B.; Sierra, A., and Mariscal, S. D-1 receptor mediated modulation of the release of gamma-aminobutyric acid by endogenous dopamine in the basal ganglia of the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1995 Sep; 19(5):727-39.
- Albin, R. L.; Young, A. B., and Penney, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 1989 Oct; 12(10):366-75.
- Albrecht, J.; Bender, A. S., and Norenberg, M. D. Potassium-stimulated GABA release is a chloride-dependent but sodium- and calcium-independent process in cultured astrocytes. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1998; 58(3):169-75.
- Alcantara, A. A.; Chen, V.; Herring, B. E.; Mendenhall, J. M., and Berlanga, M. L. Localization of dopamine D2 receptors on cholinergic interneurons of the dorsal striatum and nucleus accumbens of the rat. *Brain Res.* 2003 Oct 3; 986(1-2):22-9.
- Alexander, G. E. and Crutcher, M. D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 1990 Jul; 13(7):266-71.
- Alexander, G. E.; DeLong, M. R., and Strick, P. L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci.* 1986; 9:357-81.
- Andreoli, M.; Tessari, M.; Pilla, M.; Valerio, E.; Hagan, J. J., and Heidbreder, C. A. Selective antagonism at dopamine D3 receptors prevents nicotine-triggered relapse to nicotine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology.* 2003 Jul; 28(7):1272-80.
- Arbilla, S.; Kamal, L., and Langer, S. Z. Presynaptic GABA autoreceptors on GABAergic nerve endings of the rat substantia nigra. *Eur J Pharmacol.* 1979 Aug 1; 57(2-3):211-7.
- Arias-Montano, J. A.; Florán, B.; Florán, L.; Aceves, J., and Young, J. M. Dopamine D(1) receptor facilitation of depolarization-induced release of gamma-amino-butyric acid in rat striatum is mediated by the cAMP/PKA pathway and involves P/Q-type calcium channels. *Synapse.* 2007 May; 61(5):310-9.
- Augood, S. J.; Hollingsworth, Z. R.; Standaert, D. G.; Emson, P. C., and Penney, J. B. Jr. Localization of dopaminergic markers in the human subthalamic nucleus. *J Comp Neurol.* 2000 May 29; 421(2):247-55.
- Balon, N.; Kriem, B.; Weiss, M., and Rostain, J. C. Indirect presynaptic modulation of striatal dopamine release by GABA(B) receptors in the rat substantia nigra. *Neurosci Lett.* 2002 May 31; 325(1):33-6.

- Barone, P.; Tucci, I.; Parashos, S. A., and Chase, T. N. D-1 dopamine receptor changes after striatal quinolinic acid lesion. *Eur J Pharmacol.* 1987 Jun 12; 138(1):141-5.
- Baufreton, J.; Garret, M.; Rivera, A.; de la Calle, A.; Gonon, F.; Dufy, B.; Bioulac, B., and Taupignon, A. D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance. *J Neurosci.* 2003 Feb 1; 23(3):816-25.
- Berthele, A.; Platzer, S.; Weis, S.; Conrad, B., and Tolle, T. R. Expression of GABA(B1) and GABA(B2) mRNA in the human brain. *Neuroreport.* 2001 Oct 29; 12(15):3269-75.
- Bettler, B.; Kaupmann, K.; Mosbacher, J., and Gassmann, M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev.* 2004 Jul; 84(3):835-67.
- Bevan, M. D.; Booth, P. A.; Eaton, S. A., and Bolam, J. P. Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *J Neurosci.* 1998 Nov 15; 18(22):9438-52.
- Bevan, M. D. and Wilson, C. J. Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. *J Neurosci.* 1999 Sep 1; 19(17):7617-28.
- Billings, L. M. and Marshall, J. F. D2 antagonist-induced c-fos in an identified subpopulation of globus pallidus neurons by a direct intrapallidal action. *Brain Res.* 2003 Feb 28; 964(2):237-43.
- Billings, L. M. and Marshall, J. F. Glutamic acid decarboxylase 67 mRNA regulation in two globus pallidus neuron populations by dopamine and the subthalamic nucleus. *J Neurosci.* 2004 Mar 24; 24(12):3094-103.
- Bjorklund, A. and Lindvall, O. Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Res.* 1975 Jan 17; 83(3):531-7.
- Blandini, F.; Nappi, G.; Tassorelli, C., and Martignoni, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2000 Sep; 62(1):63-88.
- Boeckler, F.; Leng, A.; Mura, A.; Bettinetti, L.; Feldon, J.; Gmeiner, P., and Ferger, B. Attenuation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity by the novel selective dopamine D3-receptor partial agonist FAUC 329 predominantly in the nucleus accumbens of mice. *Biochem Pharmacol.* 2003 Sep 15; 66(6):1025-32.
- Bolam, J. P.; Hanley, J. J.; Booth, P. A., and Bevan, M. D. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat.* 2000 May; 196 (Pt 4):527-42.
- Bolam, J. P.; Smith, Y.; Ingham, C. A.; von Krosigk, M., and Smith, A. D. Convergence of synaptic terminals from the striatum and the globus pallidus onto single neurones in the substantia nigra and the entopeduncular nucleus. *Prog Brain Res.* 1993; 99:73-88.
- Bowery, N. GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 1989 Oct; 10(10):401-7.
- Bowery, N. G.; Bettler, B.; Froestl, W.; Gallagher, J. P.; Marshall, F.; Raiteri, M.; Bonner, T. I., and Enna, S. J. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev.* 2002 Jun; 54(2):247-64.
- Bowery, N. G. and Enna, S. J. gamma-aminobutyric acid(B) receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Jan; 292(1):2-7.

- Boyes, J. and Bolam, J. P. The subcellular localization of GABA(B) receptor subunits in the rat substantia nigra. *Eur J Neurosci.* 2003 Dec; 18(12):3279-93.
- Bustamante, D.; You, Z. B.; Castel, M. N.; Johansson, S.; Gojny, M.; Terenius, L.; Hokfelt, T., and Herrera-Marschitz, M. Effect of single and repeated methamphetamine treatment on neurotransmitter release in substantia nigra and neostriatum of the rat. *J Neurochem.* 2002 Nov; 83(3):645-54.
- Calver, A. R.; Davies, C. H., and Pangalos, M. GABA(B) receptors: from monogamy to promiscuity. *Neurosignals.* 2002 Nov-2002 Dec 31; 11(6):299-314.
- Calver, A. R.; Robbins, M. J.; Cosio, C.; Rice, S. Q.; Babbs, A. J.; Hirst, W. D.; Boyfield, I.; Wood, M. D.; Russell, R. B.; Price, G. W.; Couve, A.; Moss, S. J., and Pangalos, M. N. The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci.* 2001 Feb 15; 21(4):1203-10.
- Campusano, J. M.; Abarca, J.; Forray, M. I.; Gysling, K., and Bustos, G. Modulation of dendritic release of dopamine by metabotropic glutamate receptors in rat substantia nigra. *Biochem Pharmacol.* 2002 Apr 1; 63(7):1343-52.
- Centonze, D.; Grande, C.; Usiello, A.; Gubellini, P.; Erbs, E.; Martin, A. B.; Pisani, A.; Tognazzi, N.; Bernardi, G.; Moratalla, R.; Borrelli, E., and Calabresi, P. Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. *J Neurosci.* 2003 Jul 16; 23(15):6245-54.
- Centonze, D.; Usiello, A.; Gubellini, P.; Pisani, A.; Borrelli, E.; Bernardi, G., and Calabresi, P. Dopamine D2 receptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in mice lacking D2L receptors. *Neuropsychopharmacology.* 2002 Nov; 27(5):723-6.
- Chan, P. K.; Leung, C. K., and Yung, W. H. Differential expression of pre- and postsynaptic GABA(B) receptors in rat substantia nigra pars reticulata neurones. *Eur J Pharmacol.* 1998 May 22; 349(2-3):187-97.
- Chan, P. K. and Yung, W. H. Inhibitory postsynaptic currents of rat substantia nigra pars reticulata neurons: role of GABA receptors and GABA uptake. *Brain Res.* 1999 Aug 14; 838(1-2):18-26.
- Chapell, R.; Bueno, O. F.; Alvarez-Hernández, X.; Robinson, L. C., and Leidenheimer, N. J. Activation of protein kinase C induces gamma-aminobutyric acid type A receptor internalization in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 1998 Dec 4; 273(49):32595-601.
- Charara, A.; Galvan, A.; Kuwajima, M.; Hall, R. A., and Smith, Y. An electron microscope immunocytochemical study of GABA(B) R2 receptors in the monkey basal ganglia: a comparative analysis with GABA(B) R1 receptor distribution. *J Comp Neurol.* 2004 Aug 9; 476(1):65-79.
- Charara, A.; Heilman, T. C.; Levey, A. I., and Smith, Y. Pre- and postsynaptic localization of GABA(B) receptors in the basal ganglia in monkeys. *Neuroscience.* 2000; 95(1):127-40.
- Charara, A.; Smith, Y., and Parent, A. Glutamatergic inputs from the pedunculopontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde labeling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 1996 Jan 8; 364(2):254-66.

- Charles, K. J.; Calver, A. R.; Jourdain, S., and Pangalos, M. N. Distribution of a GABAB-like receptor protein in the rat central nervous system. *Brain Res.* 2003 Nov 7; 989(2):135-46.
- Charles, K. J.; Evans, M. L.; Robbins, M. J.; Calver, A. R.; Leslie, R. A., and Pangalos, M. N. Comparative immunohistochemical localisation of GABA(B1a), GABA(B1b) and GABA(B2) subunits in rat brain, spinal cord and dorsal root ganglion. *Neuroscience.* 2001; 106(3):447-67.
- Chatha, B. T.; Bernard, V.; Streit, P., and Bolam, J. P. Synaptic localization of ionotropic glutamate receptors in the rat substantia nigra. *Neuroscience.* 2000; 101(4):1037-51.
- Chen, B. T. and Rice, M. E. Synaptic regulation of somatodendritic dopamine release by glutamate and GABA differs between substantia nigra and ventral tegmental area. *J Neurochem.* 2002 Apr; 81(1):158-69.
- Chen, L. and Yung, W. H. Tonic activation of presynaptic GABA(B) receptors on rat pallidosubthalamic terminals. *Acta Pharmacol Sin.* 2005 Jan; 26(1):10-6.
- Cheramy, A.; Leviel, V., and Glowinski, J. Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature.* 1981 Feb 12; 289(5798):537-42.
- Cobb, W. S. and Abercrombie, E. D. Distinct roles for nigral GABA and glutamate receptors in the regulation of dendritic dopamine release under normal conditions and in response to systemic haloperidol. *J Neurosci.* 2002 Feb 15; 22(4):1407-13.
- Cooper, A. J. and Stanford, I. M. Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA(A) IPSCs in vitro. *Neuropharmacology.* 2001 Jul; 41(1):62-71.
- Cossette, M.; Levesque, M., and Parent, A. Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neurosci Res.* 1999 May; 34(1):51-4.
- Couve, A.; Filippov, A. K.; Connolly, C. N.; Bettler, B.; Brown, D. A., and Moss, S. J. Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J Biol Chem.* 1998 Oct 9; 273(41):26361-7.
- Couve, A.; Moss, S. J., and Pangalos, M. N. GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci.* 2000 Oct; 16(4):296-312.
- Couve, A.; Thomas, P.; Calver, A. R.; Hirst, W. D.; Pangalos, M. N.; Walsh, F. S.; Smart, T. G., and Moss, S. J. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation facilitates GABA(B) receptor-effector coupling. *Nat Neurosci.* 2002 May; 5(5):415-24.
- Cryan, J. F. and Kaupmann, K. Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 Jan; 26(1):36-43.
- Debeir, T.; Ginestet, L.; Francois, C.; Laurens, S.; Martel, J. C.; Chopin, P.; Marien, M.; Colpaert, F., and Raisman-Vozari, R. Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Exp Neurol.* 2005 Jun; 193(2):444-54.
- Delmas, P.; Coste, B.; Gamper, N., and Shapiro, M. S. Phosphoinositide lipid second messengers: new paradigms for calcium channel modulation. *Neuron.* 2005 Jul 21; 47(2):179-82.
- DeLong, M. R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 1990 Jul; 13(7):281-5.

- Deniau, J. M.; Kitai, S. T.; Donoghue, J. P., and Grofova, I. Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. An electrophysiological and morphological study. *Exp Brain Res.* 1982; 47(1):105-13.
- Diaz, J.; Pilon, C.; Le Foll, B.; Gros, C.; Triller, A.; Schwartz, J. C., and Sokoloff, P. Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci.* 2000 Dec 1; 20(23):8677-84.
- Durkin, M. M.; Gunwaldsen, C. A.; Borowsky, B.; Jones, K. A., and Branchek, T. A. An in situ hybridization study of the distribution of the GABA(B2) protein mRNA in the rat CNS. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 Aug 25; 71(2):185-200.
- Eggers, E. D. and Lukasiewicz, P. D. GABA(A), GABA(C) and glycine receptor-mediated inhibition differentially affects light-evoked signalling from mouse retinal rod bipolar cells. *J Physiol.* 2006 Apr 1; 572(Pt 1):215-25.
- Engberg, G.; Kling-Petersen, T., and Nissbrandt, H. GABAB-receptor activation alters the firing pattern of dopamine neurons in the rat substantia nigra. *Synapse.* 1993 Nov; 15(3):229-38.
- Enna, S. J. A GABA(B) mystery: the search for pharmacologically distinct GABA(B) receptors. *Mol Interv.* 2001 Oct; 1(4):208-18.
- Ercoli, J.; Miolan, J. P.; Niel, J. P., and Quinson, N. Presynaptic GABA-A receptors prevent depression of nicotinic transmission in rabbit coeliac ganglion neurones. *Eur J Neurosci.* 2007 Mar; 25(5):1307-18.
- Farrant, M. and Nusser, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Mar; 6(3):215-29.
- Florán, B.; Aceves, J.; Sierra, A., and Martinez-Fong, D. Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett.* 1990 Aug 14; 116(1-2):136-40.
- Florán, B.; Barajas, C.; Florán, L.; Erlij, D., and Aceves, J. Adenosine A1 receptors control dopamine D1-dependent. *Neuroscience.* 2002; 115(3):743-51.
Notes: GABA release in slices of substantia nigra pars reticulata and motor behavior in the rat
- Florán, B.; Florán, L.; Sierra, A., and Aceves, J. D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett.* 1997 Nov 14; 237(1):1-4.
- Florán, B.; Silva, I.; Nava, C., and Aceves, J. Presynaptic modulation of the release of GABA by GABAA receptors in pars compacta and by GABAB receptors in pars reticulata of the rat substantia nigra. *Eur J Pharmacol.* 1988 Jun 10; 150(3):277-86.
- Flores, G.; Liang, J. J.; Sierra, A.; Martinez-Fong, D.; Quirion, R.; Aceves, J., and Srivastava, L. K. Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neuroscience.* 1999; 91(2):549-56.
- Flores-Hernández, J.; Hernández, S.; Snyder, G. L.; Yan, Z.; Fienberg, A. A.; Moss, S. J.; Greengard, P., and Surmeier, D. J. D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J Neurophysiol.* 2000 May; 83(5):2996-3004.
- Galarraga, E.; Hernández-Lopez, S.; Reyes, A.; Miranda, I.; Bermudez-Rattoni, F.; Vilchis, C., and Bargas, J. Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci.* 1999 May 1; 19(9):3629-38.

- Galvan, A.; Florán, B.; Erij, D., and Aceves, J. Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J Neural Transm.* 2001; 108(2):153-66.
- Galvan, A.; Kuwajima, M., and Smith, Y. Glutamate and GABA receptors and transporters in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function? *Neuroscience.* 2006 Dec 1; 143(2):351-75.
- Galvan, A. and Wichmann, T. GABAergic circuits in the basal ganglia and movement disorders. *Prog Brain Res.* 2007; 160:287-312.
- Galvez, T.; Duthey, B.; Kniazeff, J.; Blahos, J.; Rovelli, G.; Bettler, B.; Prezeau, L., and Pin, J. P. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J.* 2001 May 1; 20(9):2152-9.
- Garcia, M.; Florán, B.; Arias-Montano, J. A.; Young, J. M., and Aceves, J. Histamine H3 receptor activation selectively inhibits dopamine D1 receptor-dependent. *Neuroscience.* 1997 Sep; 80(1):241-9. Notes: GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata
- Gassmann, M.; Shaban, H.; Vigot, R.; Sansig, G.; Haller, C.; Barbieri, S.; Humeau, Y.; Schuler, V.; Muller, M.; Kinzel, B.; Klebs, K.; Schmutz, M.; Froestl, W.; Heid, J.; Kelly, P. H.; Gentry, C.; Jatton, A. L.; Van der Putten, H.; Mombereau, C.; Lecourtier, L.; Mosbacher, J.; Cryan, J. F.; Fritschy, J. M.; Luthi, A.; Kaupmann, K., and Bettler, B. Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice. *J Neurosci.* 2004 Jul 7; 24(27):6086-97.
- Gerfen, C. R. The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol.* 1985 Jun 22; 236(4):454-76.
- Gerfen, C. R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *J Neural Transm Suppl.* 1992; 36:43-59.
- Gerfen, C. R.; Engber, T. M.; Mahan, L. C.; Susel, Z.; Chase, T. N.; Monsma, F. J. Jr, and Sibley, D. R. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* 1990 Dec 7; 250(4986):1429-32.
- Gerfen, C. R.; Keefe, K. A., and Gauda, E. B. D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci.* 1995 Dec; 15(12):8167-76.
- Gerfen, C. R. and Wilson, C. J. The Basal Ganglia. In: *handbook of chemical anatomy, integrated systems in the CNS, Part III* (Swanson, L. W., Björklund, A., Hökfelt, T. eds.) 1996, pp 371-468. Amsterdam: Elsevier.
- Gillies, A. and Willshaw, D. Models of the subthalamic nucleus. The importance of intranuclear connectivity. *Med Eng Phys.* 2004 Nov; 26(9):723-32.
- Giralt, M. T.; Bonanno, G., and Raiteri, M. GABA terminal autoreceptors in the pars compacta and in the pars reticulata of the rat substantia nigra are GABAB. *Eur J Pharmacol.* 1990 Jan 10; 175(2):137-44.
- Gonzalez-Hernández, T. and Rodriguez, M. Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol.* 2000 May 22; 421(1):107-35.

- Grace, A. A. and Bunney, B. S. Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res.* 1985 May 6; 333(2):271-84.
- Graybiel, A. M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1990 Jul; 13(7):244-54.
- Grofova, 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.* 1975 Jun 27; 91(2):286-91.
- Hashimoto, T. and Kuriyama, K. GABAA receptor-mediated K(+)-evoked GABA release from globus pallidus-analysis using microdialysis. *Neurochem Int.* 1997 Mar; 30(3):247-52.
- Hauber, W. and Lutz, S. Dopamine D1 or D2 receptor blockade in the globus pallidus produces akinesia in the rat. *Behav Brain Res.* 1999 Dec; 106(1-2):143-50.
- Hemsley, K. M.; Farrall, E. J., and Crocker, A. D. Dopamine receptors in the subthalamic nucleus are involved in the regulation of muscle tone in the rat. *Neurosci Lett.* 2002 Jan 14; 317(3):123-6.
- Hernández, A.; Ibanez-Sandoval, O.; Sierra, A.; Valdiosera, R.; Tapia, D.; Anaya, V.; Galarraga, E.; Bargas, J., and Aceves, J. Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors. *J Neurophysiol.* 2006 Dec; 96(6):2877-88.
- Hernández, A.; Sierra, A.; Valdiosera, R.; Florán, B.; Erij, D., and Aceves, J. Presynaptic D1 dopamine receptors facilitate glutamatergic neurotransmission in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett.* 2007 Oct 2; 425(3):188-91.
- Hoover, B. R. and Marshall, J. F. Further characterization of preproenkephalin mRNA-containing cells in the rodent globus pallidus. *Neuroscience.* 2002; 111(1):111-25.
- Ibanez-Sandoval, O.; Hernández, A.; Florán, B.; Galarraga, E.; Tapia, D.; Valdiosera, R.; Erij, D.; Aceves, J., and Bargas, J. Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurophysiol.* 2006 Mar; 95(3):1800-11.
- Jang, I. S.; Nakamura, M.; Ito, Y., and Akaike, N. Presynaptic GABAA receptors facilitate spontaneous glutamate release from presynaptic terminals on mechanically dissociated rat CA3 pyramidal neurons. *Neuroscience.* 2006; 138(1):25-35.
- Johnston, T. and Duty, S. Changes in GABA(B) receptor mRNA expression in the rodent basal ganglia and thalamus following lesion of the nigrostriatal pathway. *Neuroscience.* 2003; 120(4):1027-35.
- Jones, K. A.; Borowsky, B.; Tamm, J. A.; Craig, D. A.; Durkin, M. M.; Dai, M.; Yao, W. J.; Johnson, M.; Gunwaldsen, C.; Huang, L. Y.; Tang, C.; Shen, Q.; Salon, J. A.; Morse, K.; Laz, T.; Smith, K. E.; Nagarathnam, D.; Noble, S. A.; Branchek, T. A., and Gerald, C. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature.* 1998 Dec 17; 396(6712):674-9.
- Joseph, J. D.; Wang, Y. M.; Miles, P. R.; Budygin, E. A.; Picetti, R.; Gainetdinov, R. R.; Caron, M. G., and Wightman, R. M. Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D(3) receptors. *Neuroscience.* 2002; 112(1):39-49.

- Kaakkola, S. and Kaariainen, I. Circling behavior induced by intranigral injections of GABA and muscimol in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1980; 68(1):31-6.
- Kaupmann, K.; Malitschek, B.; Schuler, V.; Heid, J.; Froestl, W.; Beck, P.; Mosbacher, J.; Bischoff, S.; Kulik, A.; Shigemoto, R.; Karschin, A., and Bettler, B. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*. 1998 Dec 17; 396(6712):683-7.
- Kawaguchi, Y.; Wilson, C. J.; Augood, S. J., and Emson, P. C. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*. 1995 Dec; 18(12):527-35.
- Kawaguchi, Y.; Wilson, C. J., and Emson, P. C. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci*. 1990 Oct; 10(10):3421-38.
- Kita, H. and Kitai, S. T. Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol*. 1987 Jun 15; 260(3):435-52.
- Kita, H. and Kitai, S. T. The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study. *Brain Res*. 1994 Feb 14; 636(2):308-19.
- Kniazeff, J.; Galvez, T.; Labesse, G., and Pin, J. P. No ligand binding in the GB2 subunit of the GABA(B) receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits. *J Neurosci*. 2002 Sep 1; 22(17):7352-61.
- Krogsgaard-Larsen, P. and Johnston, G. A. Inhibition of GABA uptake in rat brain slices by nipecotic acid, various isoxazoles and related compounds. *J Neurochem*. 1975 Dec; 25(6):797-802.
- Kullmann, D. M.; Ruiz, A.; Rusakov, D. M.; Scott, R.; Semyanov, A., and Walker, M. C. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABA_A receptors in the CNS: where and why? *Prog Biophys Mol Biol*. 2005 Jan; 87(1):33-46.
- Lantin le Boulch, N.; Truong-Ngoc, N. A.; Gauchy, C., and Besson, M. J. *In vivo* release of newly synthesized. *Brain Res*. 1991 Sep 20; 559(2):200-10.
Notes: GABA in the substantia nigra of the rat: relative contribution of GABA striato-pallido-nigral afferents and nigral GABA neurons
- Lavoie, B.; Smith, Y., and Parent, A. Dopaminergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *J Comp Neurol*. 1989 Nov 1; 289(1):36-52.
- Lee, C. R. and Tepper, J. M. Morphological and physiological properties of parvalbumin- and calretinin-containing gamma-aminobutyric acidergic neurons in the substantia nigra. *J Comp Neurol*. 2007 Feb 10; 500(5):958-72.
- Li, S. P.; Park, M. S.; Yoon, H.; Rhee, K. H.; Bahk, J. Y.; Lee, J. H.; Park, J. S., and Kim, M. O. Differential distribution of GABA(B1) and GABA(B2) receptor mRNAs in the rat brain. *Mol Cells*. 2003 Aug 31; 16(1):40-7.
- Liang, F.; Hatanaka, Y.; Saito, H.; Yamamori, T., and Hashikawa, T. Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor-1a and -1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain. *J Comp Neurol*. 2000 Jan 24; 416(4):475-95.
- Limberger, N.; Spath, L., and Starke, K. Release of previously incorporated gamma-[3H]aminobutyric acid in rabbit caudate nucleus slices. *J Neurochem*. 1986 Apr; 46(4):1102-8.

- Lindgren, N.; Usiello, A.; Goiny, M.; Haycock, J.; Erbs, E.; Greengard, P.; Hokfelt, T.; Borrelli, E., and Fisone, G. Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1; 100(7):4305-9.
- Lindvall, O. and Bjorklund, A. Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Res*. 1979 Aug 17; 172(1):169-73.
- Margeta-Mitrovic, M.; Mitrovic, I.; Riley, R. C.; Jan, L. Y., and Basbaum, A. I. Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 1999 Mar 15; 405(3):299-321.
- Marino, M. J.; Wittmann, M.; Bradley, S. R.; Hubert, G. W.; Smith, Y., and Conn, P. J. Activation of group I metabotropic glutamate receptors produces a direct excitation and disinhibition of GABAergic projection neurons in the substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci*. 2001 Sep 15; 21(18):7001-12.
- Matuszewich, L. and Yamamoto, B. K. Modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra. *Synapse*. 1999 Apr; 32(1):29-36.
- Medina, L. and Reiner, A. Neurotransmitter organization and connectivity of the basal ganglia in vertebrates: implications for the evolution of basal ganglia. *Brain Behav Evol*. 1995; 46(4-5):235-58.
- Mehta, A. K. and Ticku, M. K. An update on GABAA receptors. *Brain Res Brain Res Rev*. 1999 Apr; 29(2-3):196-217.
- Merello, M. and Cammarota, A. [Functional anatomy of the basal ganglia]. *Rev Neurol*. 2000 Jun 1-2000 Jun 15; 30(11):1055-60.
- Miller, A. S. and Walker, J. M. Effects of a cannabinoid on spontaneous and evoked neuronal activity in the substantia nigra pars reticulata. *Eur J Pharmacol*. 1995 Jun 12; 279(2-3):179-85.
- Mink, J. W. and Thach, W. T. Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior. *Curr Opin Neurobiol*. 1993 Dec; 3(6):950-7.
- Misgeld, U. Innervation of the substantia nigra. *Cell Tissue Res*. 2004 Oct; 318(1):107-14.
- Misgeld, U.; Bijak, M., and Jarolimek, W. A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*. 1995 Jul; 46(4):423-62.
- Missale, C.; Nash, S. R.; Robinson, S. W.; Jaber, M., and Caron, M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 1998 Jan; 78(1):189-225.
- Mohler, H. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res*. 2006 Nov; 326(2):505-16.
- Morikawa, H.; Khodakhah, K., and Williams, J. T. Two intracellular pathways mediate metabotropic glutamate receptor-induced Ca²⁺ mobilization in dopamine neurons. *J Neurosci*. 2003 Jan 1; 23(1):149-57.
- Nakanishi, H.; Kita, H., and Kitai, S. T. Intracellular study of rat substantia nigra pars reticulata neurons in an in vitro slice preparation: electrical membrane properties and response characteristics to subthalamic stimulation. *Brain Res*. 1987 Dec 22; 437(1):45-55.
- Nava-Asbell, C.; Paz-Bermudez, F.; Erlij, D.; Aceves, J., and Florán, B. GABA(B) receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-mediated facilitation of. *Neuropharmacology*. 2007 Oct; 53(5):631-7.

- Nava-Asbell, C. J., Silva, I., Floran, L., Aceves., Floran, B., Inhibition of GABA release by GABA B receptors in substantia nigra pars reticulata is mediated by dopamine. Soc. Neurosci. Abstr. 2003. 679.3.
- Nestler, E. J., Hyman, S. E., Malenka, R. C. Molecular Neuropharmacology. A Foundation for Clinical Neuroscience. 2001. The McGraw-Hill Companies, Inc. pp.157-162.
- Ng, T. K. and Yung, K. K. Distinct cellular distribution of GABA(B)R1 and GABA(A)alpha1 receptor immunoreactivity in the rat substantia nigra. Neuroscience. 2000; 99(1):65-76.
- Ng, T. K. and Yung, K. K. Subpopulations of neurons in rat substantia nigra display GABA(B)R2 receptor immunoreactivity. Brain Res. 2001 Nov 30; 920(1-2):210-6.
- Ni, Z.; Gao, D.; Bouali-Benazzouz, R.; Benabid, A. L., and Benazzouz, A. Effect of microiontophoretic application of dopamine on subthalamic nucleus neuronal activity in normal rats and in rats with unilateral lesion of the nigrostriatal pathway. Eur J Neurosci. 2001 Jul; 14(2):373-81.
- Paladini, C. A.; Celada, P., and Tepper, J. M. Striatal, pallidal, and pars reticulata evoked inhibition of nigrostriatal dopaminergic neurons is mediated by GABA(A) receptors *in vivo*. Neuroscience. 1999 Mar; 89(3):799-812.
- Palmer, M. J. Functional segregation of synaptic GABAA and GABAC receptors in goldfish bipolar cell terminals. J Physiol. 2006 Nov 15; 577(Pt 1):45-53.
- Panzanelli, P.; Homanics, G. E.; Ottersen, O. P.; Fritschy, J. M., and Sasso-Pognetto, M. Pre- and postsynaptic GABA receptors at reciprocal dendrodendritic synapses in the olfactory bulb. Eur J Neurosci. 2004 Dec; 20(11):2945-52.
- Parent, A.; Cote, P. Y., and Lavoie, B. Chemical anatomy of primate basal ganglia. Prog Neurobiol. 1995 Jun; 46(2-3):131-97.
- Parent, A.; Levesque, M., and Parent, M. A re-evaluation of the current model of the basal ganglia. Parkinsonism Relat Disord. 2001 Jul; 7(3):193-198.
- Paxinos, G. and Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 1997. Academic Press, San Diego, CA.
- Penney, J. B. Jr and Young, A. B. Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. Annu Rev Neurosci. 1983; 6:73-94.
- Poisik, O. V.; Mannaioni, G.; Traynelis, S.; Smith, Y., and Conn, P. J. Distinct functional roles of the metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in the rat globus pallidus. J Neurosci. 2003 Jan 1; 23(1):122-30.
- Prensa, L.; Cossette, M., and Parent, A. Dopaminergic innervation of human basal ganglia. J Chem Neuroanat. 2000 Dec; 20(3-4):207-13.
- Prensa, L.; Gimenez-Amaya, J. M., and Parent, A. Chemical heterogeneity of the striosomal compartment in the human striatum. J Comp Neurol. 1999 Nov 1; 413(4):603-18.
- Prensa, L. and Parent, A. The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. J Neurosci. 2001 Sep 15; 21(18):7247-60.

- Radnikow, G. and Misgeld, U. Dopamine D1 receptors facilitate GABA_A synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci*. 1998 Mar 15; 18(6):2009-16.
- Reiner, A. and Anderson, K. D. The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings. *Brain Res Brain Res Rev*. 1990 Sep-1990 Dec 31; 15(3):251-65.
- Reiner, A.; Medina, L., and Haber, S. N. The distribution of dynorphinergic terminals in striatal target regions in comparison to the distribution of substance P-containing and enkephalinergic terminals in monkeys and humans. *Neuroscience*. 1999; 88(3):775-93.
- Richerson, G. B. Looking for GABA in all the wrong places: the relevance of extrasynaptic GABA(A) receptors to epilepsy. *Epilepsy Curr*. 2004 Nov-2004 Dec 31; 4(6):239-42.
- Rivera, A.; Cuellar, B.; Giron, F. J.; Grandy, D. K.; de la Calle, A., and Moratalla, R. Dopamine D4 receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matrix compartments of the striatum. *J Neurochem*. 2002 Jan; 80(2):219-29.
- Rivera, A.; Trias, S.; Penafiel, A.; Angel Narvaez, J.; Diaz-Cabiale, Z.; Moratalla, R., and de la Calle, A. Expression of D4 dopamine receptors in striatonigral and striatopallidal neurons in the rat striatum. *Brain Res*. 2003 Oct 31; 989(1):35-41.
- Robertson, G. S. and Robertson, H. A. Evidence that the substantia nigra is a site of action for L-DOPA. *Neurosci Lett*. 1988 Jun 29; 89(2):204-8.
- Rosales, M. G.; Martinez-Fong, D.; Morales, R.; Nunez, A.; Flores, G.; Gongora-Alfaro, J. L.; Florán, B., and Aceves, J. Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study. *Neuroscience*. 1997 Oct; 80(3):803-10.
- Sakurai, T.; Hell, J. W.; Woppmann, A.; Miljanich, G. P., and Catterall, W. A. Immunochemical identification and differential phosphorylation of alternatively spliced forms of the alpha 1A subunit of brain calcium channels. *J Biol Chem*. 1995 Sep 8; 270(36):21234-42.
- Sano, H.; Yasoshima, Y.; Matsushita, N.; Kaneko, T.; Kohno, K.; Pastan, I., and Kobayashi, K. Conditional ablation of striatal neuronal types containing dopamine D2 receptor disturbs coordination of basal ganglia function. *J Neurosci*. 2003 Oct 8; 23(27):9078-88.
- Santiago, M.; Cano, J., and Westerink, B. H. Are bilateral nigrostriatal dopaminergic pathways functionally linked in the rat brain? A microdialysis study in conscious rats. *Brain Res*. 1993 Nov 19; 628(1-2):187-92.
- Santiago, M. and Westerink, B. H. The regulation of dopamine release from nigrostriatal neurons in conscious rats: the role of somatodendritic autoreceptors. *Eur J Pharmacol*. 1991 Oct 29; 204(1):79-85.
- Schroeder, J. A.; Hummel, M., and Unterwald, E. M. Disruption of G(i/o) protein signaling in the nucleus accumbens results in a D1 dopamine receptor-mediated hyperactivity. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004 Sep; 79(1):93-9.
- Scott, L.; Kruse, M. S.; Forssberg, H.; Brismar, H.; Greengard, P., and Aperia, A. Selective up-regulation of dopamine D1 receptors in dendritic spines by NMDA receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5; 99(3):1661-4.
- Seino, S. and Shibasaki, T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev*. 2005 Oct; 85(4):1303-42.

- Shapiro, M. S.; Wollmuth, L. P., and Hille, B. Modulation of Ca²⁺ channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons. *J Neurosci.* 1994 Nov; 14(11 Pt 2):7109-16.
- Shen, K. Z. and Johnson, S. W. Presynaptic GABA(B) receptors inhibit synaptic inputs to rat subthalamic neurons. *Neuroscience.* 2001; 108(3):431-6.
- Shen, K. Z. and Johnson, S. W. Presynaptic GABAB and adenosine A1 receptors regulate synaptic transmission to rat substantia nigra reticulata neurones. *J Physiol.* 1997 Nov 15; 505 (Pt 1):153-63.
- Sieghart, W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* 1995 Jun; 47(2):181-234.
- Simonds, W. F. G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci.* 1999 Feb; 20(2):66-73.
- Smeets, W. J.; Marin, O., and Gonzalez, A. Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *J Anat.* 2000 May; 196 (Pt 4):501-17.
- Smith, Y.; Bevan, M. D.; Shink, E., and Bolam, J. P. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience.* 1998 Sep; 86(2):353-87.
- Smith, Y. and Bolam, J. P. Convergence of synaptic inputs from the striatum and the globus pallidus onto identified nigrocollicular cells in the rat: a double anterograde labelling study. *Neuroscience.* 1991; 44(1):45-73.
- Smith, Y.; Parent, A.; Seguela, P., and Descarries, L. Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol.* 1987 May 1; 259(1):50-64.
- Smith, Y.; Wichmann, T., and DeLong, M. R. Synaptic innervation of neurones in the internal pallidal segment by the subthalamic nucleus and the external pallidum in monkeys. *J Comp Neurol.* 1994 May 8; 343(2):297-318.
- Starr, M. S. Effects of metabolic inhibitors on amino acid metabolism in rat retina: a comparison of amino-oxyacetic acid and ethanolamine-o-sulphate. *J Neurochem.* 1975 Jun; 24(6):1229-36.
- Stefani, A.; Spadoni, F.; Martorana, A.; Lavaroni, F.; Martella, G.; Sancesario, G., and Bernardi, G. D2-mediated modulation of N-type calcium currents in rat globus pallidus neurons following dopamine denervation. *Eur J Neurosci.* 2002 Mar; 15(5):815-25.
- Sudhof, T. C. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.* 2004; 27:509-47.
- Svenningsson, P. and Le Moine, C. Dopamine D1/5 receptor stimulation induces c-fos expression in the subthalamic nucleus: possible involvement of local D5 receptors. *Eur J Neurosci.* 2002 Jan; 15(1):133-42.
- Szabo, J. Projections from the body of the caudate nucleus in the rhesus monkey. *Exp Neurol.* 1970 Apr; 27(1):1-15.
- Thuault, S. J.; Brown, J. T.; Sheardown, S. A.; Jourdain, S.; Fairfax, B.; Spencer, J. P.; Restituito, S.; Nation, J. H.; Topps, S.; Medhurst, A. D.; Randall, A. D.; Couve, A.; Moss, S. J.; Collingridge, G. L.; Pangalos, M. N.; Davies, C. H., and Calver, A. R. The GABA(B2) subunit is critical for the trafficking and function of native GABA(B) receptors. *Biochem Pharmacol.* 2004 Oct 15; 68(8):1655-66.

- Tofighy, A.; Abbott, A.; Centonze, D.; Cooper, A. J.; Noor, E.; Pearce, S. M.; Puntis, M.; Stanford, I. M.; Wigmore, M. A., and Lacey, M. G. Excitation by dopamine of rat subthalamic nucleus neurones in vitro—a direct action with unconventional pharmacology. *Neuroscience*. 2003; 116(1):157-66.
- Trevitt, T.; Carlson, B.; Correa, M.; Keene, A.; Morales, M., and Salamone, J. D. Interactions between dopamine D1 receptors and gamma-aminobutyric acid mechanisms in substantia nigra pars reticulata of the rat: neurochemical and behavioral studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 Jan; 159(3):229-37.
- Vallone, D.; Picetti, R., and Borrelli, E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000 Jan; 24(1):125-32.
- Waddington, J. L. Induction of rotational behaviour by intranigral baclofen suggests possible GABA-agonist activity. *Experientia*. 1977 Oct 15; 33(10):1345-6.
- Waldvogel, H. J.; Billinton, A.; White, J. H.; Emson, P. C., and Faull, R. L. Comparative cellular distribution of GABAA and GABAB receptors in the human basal ganglia: immunohistochemical colocalization of the alpha 1 subunit of the GABAA receptor, and the GABABR1 and GABABR2 receptor subunits. *J Comp Neurol*. 2004 Mar 15; 470(4):339-56.
- Waldvogel, H. J.; Kubota, Y.; Fritschy, J.; Mohler, H., and Faull, R. L. Regional and cellular localisation of GABA(A) receptor subunits in the human basal ganglia: An autoradiographic and immunohistochemical study. *J Comp Neurol*. 1999 Dec 20; 415(3):313-40.
- Wallmichrath, I. and Szabo, B. Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. *Neuroscience*. 2002; 113(3):671-82.
- Wamsley, J. K.; Hunt, M. E.; McQuade, R. D., and Alburges, M. E. [3H]SCH39166, a D1 dopamine receptor antagonist: binding characteristics and localization. *Exp Neurol*. 1991 Feb; 111(2):145-51.
- Westerink, B. H.; de Boer, P.; Santiago, M., and De Vries, J. B. Do nerve terminals and cell bodies of nigrostriatal dopaminergic neurons of the rat contain similar receptors? *Neurosci Lett*. 1994 Feb 14; 167(1-2):109-12.
- White, J. H.; Wise, A.; Main, M. J.; Green, A.; Fraser, N. J.; Disney, G. H.; Barnes, A. A.; Emson, P.; Foord, S. M., and Marshall, F. H. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*. 1998 Dec 17; 396(6712):679-82.
- Windels, F. and Kiyatkin, E. A. Dopamine action in the substantia nigra pars reticulata: iontophoretic studies in awake, unrestrained rats. *Eur J Neurosci*. 2006 Sep; 24(5):1385-94.
- Wise, A.; Green, A.; Main, M. J.; Wilson, R.; Fraser, N., and Marshall, F. H. Calcium sensing properties of the GABA(B) receptor. *Neuropharmacology*. 1999 Nov; 38(11):1647-56.
- Wittmann, M.; Marino, M. J.; Bradley, S. R., and Conn, P. J. Activation of group III mGluRs inhibits GABAergic and glutamatergic transmission in the substantia nigra pars reticulata. *J Neurophysiol*. 2001 May; 85(5):1960-8.
- Wittmann, M.; Marino, M. J., and Conn, P. J. Dopamine modulates the function of group II and group III metabotropic glutamate receptors in the substantia nigra pars reticulata. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Aug; 302(2):433-41.
- Wu, Y.; Richard, S., and Parent, A. The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci Res*. 2000 Sep; 38(1):49-62.

- Yung, K. K.; Bolam, J. P.; Smith, A. D.; Hersch, S. M.; Ciliax, B. J., and Levey, A. I. Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience*. 1995 Apr; 65(3):709-30.
- Zhu, Z.; Bartol, M.; Shen, K., and Johnson, S. W. Excitatory effects of dopamine on subthalamic nucleus neurons: in vitro study of rats pretreated with 6-hydroxydopamine and levodopa. *Brain Res*. 2002 Jul 26; 945(1):31-40.
- Zhu, Z. T.; Shen, K. Z., and Johnson, S. W. Pharmacological identification of inward current evoked by dopamine in rat subthalamic neurons in vitro. *Neuropharmacology*. 2002 May; 42(6):772-81.