

03062
6
2 ej.



Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los ciclos Profesional y de Posgrado
del Colegio de Ciencias y Humanidades
Instituto de Fisiología Celular

"Estudio sobre los Mecanismos de las Alteraciones
Motoras Producidas por la Administración
Intranigral de Rojo de Rutenio"

Trabajo de Tesis que presenta El Biólogo

Jorge Luis Valente Flores Hernández

Para obtener el grado de Maestría en Investigación
Biomédica Básica (Especialidad Neurociencias)

Cd. Universitaria México, D.F. 1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ORGANIZACION DE LA TESIS

Esta tesis consta de seis partes: La primera parte está constituida por un resumen del trabajo de tesis. La segunda parte contiene una introducción al proyecto de tesis. La tercera parte contiene los antecedentes acerca de las principales substancias empleadas en este estudio y de la estructura cerebral estudiada, así como una breve revisión sobre la conducta de giro. La cuarta parte está constituida por los objetivos e hipótesis de esta tesis. La quinta sección es la de Resultados e incluye un trabajo enviado a publicación, una figura comentada en dicho trabajo, pero no mostrada, y algunos estudios adicionales. En la sexta y última sección se presenta una discusión global y las conclusiones obtenidas de este trabajo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE

A)	RESUMEN	1
B)	INTRODUCCION	3
C)	ANTECEDENTES	
	I. SUSTANCIAS USADAS	
	El rojo de rutonio	5
	La 4-aminopiridina	8
	II. ESTRUCTURA ESTUDIADA	
	La sustancia negra	10
	Localización	10
	Fisiología	11
	Citología	12
	Neuroquímica	15
	Conexiones	14
	III. LA CONDUCTA DE GIRO	17
	Estructuras cerebrales relacionadas con la conducta de giro	20
	Los neurotransmisores y la conducta de giro	21
D)	OBJETIVOS	25
E)	RESULTADOS	30
	1. TRABAJO ENVIADO A PUBLICACION	
	A.- Efecto de la administración unilateral intranigral de 5Rú y de la 4AP sobre la conducta motora comparados con el efecto producido por la administración intranigral de munitol en este mismo sitio.	31

B.- Efecto del pretratamiento con el antagonista al receptor dopaminérgico (D_1 - D_2), el haloperidol, sobre la conducta de giro inducida por el RRu en NT y NE de la SN.	32
C.- Efecto de la inyección intranigral del RRu sobre la liberación de ^{3}H -DOPAMINA estimulada por alto potasio (HK^+) de rabanadas de SN.	33
D.- Manuscrito del trabajo enviado para revisión. (Pag. 1-30)	35

II ESTUDIOS POSTERIORES A LA EDICION DEL MANUSCRITO PRESENTADO EN LA PRIMERA FASE

A.- Estudio del efecto de la conservación SABANICA mediante la utilización de la neurotoxina, ácido quinolínicó	36
B.- Estudio del efecto de la administración del muscimol en el núcleo ventromedial talámico sobre la conducta de giro inducida por la administración intranigral del rojo de ruceno	40
F) DISCUSION GLOBAL	43
G) CONCLUSIONES	55
H) REFERENCIAS	56

RESUMEN

En esta tesis se estudiaron los efectos sobre la conducta motora de la microinyección unilateral intranigral de rojo de rubenio y 4-aminopiridina, y se compararon con los efectos conductuales producidos por el muscimol. Las tres sustancias empleadas produjeron giro contralateral cuando estas fueron inyectadas en la región central o región de proyección nigrotalámica de la parte reticulada de la sustancia negra. El muscimol fue el más efectivo para inducir dicha conducta pero su efecto, al igual que la 4-aminopiridina, desapareció dentro de las primeras 3 a 4 horas, mientras que el efecto del RbV se mantuvo después de 3 días. En algunos experimentos se encontró una marcada pérdida celular en la zona de difusión del rojo de rubenio. Cuando se inyectó el rojo de rubenio en la región caudo-ventrodorsal (o región de proyección nigroestriatal) de la sustancia negra, este colorante produjo un giro ipsilateral de alta frecuencia, de la misma manera, la 4-aminopiridina produjo este mismo giro ipsilateral pero con menor frecuencia, sin embargo, el muscimol en esta región siguió induciendo el giro con dirección contralateral. El pretratamiento con haloperidol (1g.) abolió totalmente el efecto del rojo de rubenio después de su inyección en la región de proyección nigroestriatal, pero sólo parcialmente después de la inyección del colorante en la zona nigrotalámica. El efecto del muscimol, en cualquiera de las dos regiones estudiadas, sólo fue ligeramente disminuido por el haloperidol. La conservación de la vía estriatonigral, a través del uso de la neurotoxina ácido quinolínico, solo disminuyó la conducta de giro inducida por el

rojo de rutenio en los primeros 30 minutos, ya que posteriormente a estos, ya no tuvo ningún efecto. La administración de muscimol en el núcleo ventromedial talámico abolió la conducta de giro inducida por la administración del colorante en la región nigrotalámica, sin que el muscimol indujera per se conducta de giro. La revisión histológica mostró que el rojo de rutenio microinyectado se localizó principalmente en el interior de las somas neuronales.

Con esto concluimos que el incremento en la liberación de GABA y/o dopamina se probablemente responsable de la inducción de la conducta de giro por 4-aminopiridina, pero los efectos del RRu parecen ser secundarios a su penetración en las somas neuronales. Las neuronas dopaminérgicas parecen jugar un papel importante en la conducta de giro ipsilateral inducido por el RRu cuando este es inyectado en la zona nigroestriatal, así mismo, la vía GABAérgica nigrotalámica está involucrada en la inducción del giro contralateral cuando el rojo de rutenio es inyectado en la región nigrotalámica.

INTRODUCCION

Dentro de los procesos más importantes que regulan la función sináptica, y por lo tanto, la liberación de neurotransmisores, está el movimiento del catión calcio (Ca^{2+} , Rubin, 1962; Miller, 1960; Smith *et al.*, 1969, Tsien *et al.*, 1969). Se han desarrollado técnicas tanto *in vitro* como *in vivo* con el fin de conocer dichos procesos. En el primer caso se han empleado homogenizados de cerebro completo o, rebanadas o sinaptosomas de regiones específicas para cuantificar la liberación dependiente de Ca^{2+} de neurotransmisores y la captura de Ca^{2+} en dichas preparaciones; en el segundo caso, *in vivo*, se han utilizado animales íntegros a los que se les han administrado diversos fármacos por diferentes vías; en estos experimentos se han cuantificado variables conductuales y/o electrofisiológicas. Sin embargo, para poder aproximarse al entendimiento de los fenómenos fisiológicos que se llevan a cabo en los seres vivos, dado que la extrapolación *in vitro-in vivo* no es fácil, se han implementado modelos *ex vivo*. Estos modelos constan de dos partes, la primera, en la que al sujeto experimental *in vivo* se le administra un fármaco por alguna vía cuantificando parámetros conductuales y/o electrofisiológicos y en la segunda, se le sacrifica aislando alguna estructura para posteriormente realizar experimentos *in vitro*.

En esta tesis utilizamos la aproximación *ex vivo* para estudiar los mecanismos de la alteraciones motoras producidas por la administración unilateral intranigral de dos agentes que modifican la permeabilidad del Ca^{2+} ; dichos agentes son el rojo

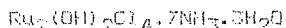
de rutenio (RRu) y la 4-aminopiridina (4AP) un bloqueador y un activador respectivamente de los movimientos de Ca^{2+} , efectos que son comparados con un agonista al receptor del tipo "A" del ácido gamma-butyrico (GABA), el muscimol.

ANTECEDENTES

I. SUBSTANCIAS USADAS EN ESTE TRABAJO

ROJO DE RUTENIO

El rojo de rutenio (Oxocloruro de rutenio amoniacal) tiene la siguiente estructura:



Por su capacidad de unirse a mucopolisacáridos, el catión inorgánico rojo de rutenio (RRu) ha sido utilizado en microscopía electrónica para la tinción de membrana citoplásmica (Luft, 1971). Bondareff (Citado por Moore, 1971) observó que también las membranas mitocondriales eran teñidas con el RRu. Por otro lado, Nakao (Moore, 1971) propuso que los grupos sulfato y carboxilo de los mucopolisacáridos eran buenos candidatos para la unión de Ca^{2+} . Con estos datos Moore (1971) realizó un experimento en el que suponía que, si el RRu se unía a mucopolisacáridos en el sitio de unión del Ca^{2+} , entonces podría haber un antagonismo entre dichos ligandos. Así concluyó que:

"The ability of rat liver mitochondria to transport calcium ions has been found inhibited specifically by the dye ruthenium red. Since this dye reacts specifically with mucopolisaccharides, and since energy conservation is not inhibited by this dye, it is concluded that mucopolisaccharides (in the form of mucoproteins or mucos or glycolipids) are the active center of the sites of mediation of mitochondrial Ca^{++} transport" (Moore, 1971).

Después de los estudios realizados por Moore y con base en estos, Rahamimoff y Alnaes (1973) estudiaron el efecto del RRu sobre la transmisión neuromuscular. En este trabajo encuentran

que el RRu inhibe la transmisión neuromuscular por un mecanismo presináptico, a saber, la inhibición del influjo de Ca^{2+} . Sin embargo, encuentran un incremento en la frecuencia de los potenciales de placa terminal y de la liberación retardada, los cuales son explicados por los hallazgos de Singer *et al.* (1972), quienes observaron una entrada de RRu en las fibras nerviosas periféricas. De este modo, el RRu, suponiendo que pudiera llegar a las mitocondrias e inhibir la captura de Ca^{2+} por éstas, produciría un incremento de los niveles de Ca^{2+} citoplásmico, lo cual explicaría el incremento en la liberación retardada de neurotransmisores encontrada por Rahamimoff y Aibaes (1973). En este tiempo Vasington *et al.* (1972) reportaron el efecto del RRu sobre el transporte de Ca^{2+} y la respiración en mitocondrias hepáticas de rata; en este estudio, además de la inhibición de la captura de Ca^{2+} por las mitocondrias (a concentraciones de 3-6 nmolas/mg de proteína mitocondrial), encontraron que a dosis ligeramente mayores, se produce una marcada inhibición del estado 4 respiratorio, y se altera la estimulación por ADP o P_i , pero no se inhibe. Por otro lado, Madeira y Antunes-Madeira (1974) reportaron la interacción de RRu con el sarcolema aislado encontrando que este colorante (10 μM) inhibe del 50% a 70% la unión de Ca^{2+} por el sarcolema.

Además del papel del Ca^{2+} en la fisiología de la mitocondria, los nervios periféricos y en el músculo, es bien conocido el papel del Ca^{2+} para la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC) (Brink, 1954; Miledi y Slater, 1965; Katz y Miledi, 1967; Rubin, 1982). A este respecto, Kamino *et al.* (1976) estudiaron los efectos del RRu sobre la naturaleza

cooperativa de la unión de Ca^{2+} en sinaptosomas aislados de corteza cerebral de rata. En este estudio encontraron que el RRU tiene una interacción de tipo competitivo con el Ca^{2+} .

Con base en los datos obtenidos por los autores anteriores, Tapia et al (1976) realizaron el primer estudio in vivo sobre el efecto del RRU en el transporte de Ca^{2+} . En este estudio administraron RRU intracerebral (i.c.) e intraperitonealmente (i.p.) en ratones, y encontraron que la administración i.c. de RRU produce status epilepticus y convulsiones tónicas, mientras que la administración i.p. del colorante indujo una parálisis flácida total que terminó después de varias horas. Dichos efectos fueron parcialmente antagonizados por la administración simultánea de CaCl_2 . En este trabajo también se administró el RRU tanto intraventricular (i.v.) como intra-hipocámpicamente (i.h.) a través de una cánula implantada permanentemente en gatos, y se encontró que a los pocos minutos apareció una actividad paroxística en todas las regiones cerebrales registradas. Después de varias horas de dicha administración, los animales desarrollaron ataques gran mal típicos e incluso murieron en convulsión tónico-clónica generalizada.

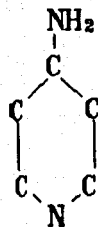
Estos resultados fueron explicados por dos mecanismos que dependen básicamente de la vía de administración: a) el efecto de la administración i.p. del RRU es debido a un bloqueo de la liberación de acetilcolina (AC) en la placa neuromuscular, lo que se manifiesta conductualmente como parálisis flácida; b) el efecto de la administración i.c., i.v. e i.h. del RRU es explicado con base en el hecho de que los neurotransmisores inhibidores como el GABA juegan un papel importante en la

excitabilidad, de modo que el RRu al inhibir la liberación de este aminoácido, produciría una desinhibición generalizada y en consecuencia las convulsiones. Posteriormente Tapia y Meza-Ruiz (1977) realizaron un experimento para apear el mecanismo propuesto que producía las convulsiones. En dicho estudio encontraron una inhibición por RRu de la liberación de [HI-GABA dependiente de Ca^{2+} en fracciones sinaptosomales de cerebro completo de ratón. Después, Meza-Ruiz y Tapia (1978), demostraron la inhibición de la liberación de [HI-GABA dependiente de Ca^{2+} producida por la administración i.c. de RRu en ratones.

Por lo anterior se concluye que:

El RRu inhibe la unión de Ca^{2+} a membranas biológicas a concentraciones menores de 100 μM ; este efecto inhibe los procesos fisiológicos mediados por Ca^{2+} como la transmisión neuromuscular, la actividad mitocondrial (específicamente el estado 4), y la liberación de transmisores dependiente de Ca^{2+} .

4-AMINOPIRIDINA.



4-AMINOPIRIDINA

Existe evidencia de que las aminopiridinas como la 4-aminopiridina (4AP) y la 3,4-diaminopiridina facilitan al influjo de Ca^{2+} a concentraciones en la que se no observado un incremento de la liberación de neurotransmisores, en concentraciones menores a las requeridas para su bien conocido efecto bloqueador sobre el canal de potasio (Lundh y Thesleff,

1977; Lundh, 1978; Thésleff, 1980; Kita et al., 1981; Rogawsky y Barker, 1983; Kita et al., 1985). Asimismo se ha demostrado que la 4AP parece facilitar la entrada de Ca^{2+} en sinaptosomas (Pasantes-Morales y Arzate, 1981; Agoston, 1985). Tapia y Sitges (1982) encontraron que la 4AP induce un incremento diezfoldante de Ca^{2+} en la liberación espontánea de neurotransmisores en sinaptosomas, que posteriormente (Tapia et al., 1985) explicaron por un posible efecto facilitador de la 4AP sobre el acoplamiento funcional de la entrada de Ca^{2+} con la secreción, en la membrana sinaptosomal. En experimentos *in vivo* se ha administrado 4AP (5mg/kg, i.p.) en la rata y el ratón, y se ha encontrado que produce crisis convulsivas tónico-clónicas generalizadas que pueden explicarse por un aumento de la transmisión sináptica excitatoria o bien por un aumento de la actividad espontánea de alguna región cerebral susceptible de convertirse en un foco epileptogénico (Pasantes-Morales et al., 1987).

Por lo anterior se concluye que:

La 4AP facilita la liberación de neurotransmisores por un mecanismo mediado por Ca^{2+} en las terminales sinápticas, en el SNC.

II. ESTRUCTURA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL ESTUDIADA EN ESTE TRABAJO

LA SUSTANCIA NEGRA

La sustancia negra (SN) fue descrita inicialmente por Vicq d'Azir más de 200 años (1780). Recibe su nombre por el color oscuro que presenta en los mamíferos superiores, y que proviene de la neuromelanina que se localiza en lisosomas de neuronas de la parte compacta de éste núcleo (Dray y Straughan, 1976).

Localización de la SN.

La SN es el núcleo de mayor tamaño del mesencefalo. Se localiza en posición dorsal al pedúnculo cerebral, ventrolateral al lemnisco medio y bordeada por el área tegmental ventral (ATV). Se divide en tres regiones: la parte reticulada (SNr), en que la mayor parte está constituida por el neuropilo que, visto con la técnica de Golgi, semeja una red de pequeñas fibras que cursan generalmente en dirección antero-posterior y dorso-ventral. La segunda, la parte compacta (SNc) forma una densa y delgada capa de células en posición dorso-medial a la parte reticulada y ventro-lateral al lemnisco medio; en esta zona se localizan células pigmentadas debido a las cuales la SN recibe su nombre. Se ha propuesto que la SNc forma un continuo con el ATV, y que en su mayor parte las neuronas de ambas regiones son dopaminérgicas, aunque la SNc proyecta principalmente al estriado a diferencia de la ATV que proyecta hacia el sistema límbico. La tercera región de la SN, la parte lateral (SNl), tiene una forma elíptica y se une al eje lateral del tallo cerebral entre la SNr

dorsolateral y el borde lateral del núcleo geniculado lateral. Pese a que es la región filogenéticamente más antigua, se le ha dado poca atención tanto desde el punto de vista anatómico como fisiológico (Dray, 1979; Kandel, 1985).

Fisiología de la SN.

Debido a su estrecha relación, tanto funcional como anatómica con los núcleos del sistema extrapiramidal, la SN ha sido considerada como un núcleo de los ganglios basales (Nauta y Domesick, 1964; Kandel, 1985). Se ha postulado a la SN como un núcleo intermedio para la comunicación estriatal hacia el tálamo, el tectum, la formación reticular mesencefálica y la sustancia gris periacueductal (mesencefálica). Así, la SN tiene la función de regular la influencia estriatal sobre movimientos oculares y movilidad cefálica a través de la vía GABAérgica estrato-nigral y de la SN al tectum por una vía GABAérgica nigrocolicular (Chevalier *et al.*, 1985; Deniau *et al.*, 1985). Por otro lado, se ha propuesto que el sistema dopaminérgico nigro-estriatal juega un importante papel modulador sobre la fisiología estriatal, actuando sobre las interneuronas colinérgicas en el estriado. Esta vía, junto con la nigroestriatal dopaminérgica, conforma el circuito estrato-nigral-estriatal, integrado como sigue: Por un lado, la vía descendente o estrato-nigral, en la que se ha postulado que coexiste el GABA y el neuropéptido sustancia P. Sin embargo, existe evidencia de que dichos neurotransmisores están en neuronas estratonigrales separadas (Gale, *et al.*, 1977); también se han identificado neuropéptidos de las familias de las endorfinas y encefalinas. Se ha observado que esta última vía regula la actividad de las neuronas dopaminérgicas que se

localizan en la parte compacta de la SN, mediante una acción sobre las dendritas que bajan a la parte reticulada de la SN (Gray, 1977). Sin embargo, se ha encontrado que la activación del receptor de GABA del tipo "A" en la SN por el muscimol induce un incremento paradójico en la actividad dopaminérgica estriatal (Grace y Dunney, 1979). Por otro lado, la vía ascendente o nigroestriatal del circuito utiliza la dopamina como transmisor para inhibir la actividad estriatal (Scheel-Krüger *et al.*, 1981).

Citología de la SN.

Las neuronas en la SN se clasifican con base en el tamaño del cuerpo celular, el grosor de las dendritas y la ramificación de éstas.

Existen neuronas grandes y medianas que miden 45-74 μm y 16-46 μm en sus ejes mayor y menor respectivamente; la forma del cuerpo varía ampliamente, pudiendo ser fusiformes, triangulares, poligonales u ovoides. Las neuronas pequeñas miden de 11 a 26 μm y se caracterizan por sus finas dendritas que radian en todas direcciones (Juraska *et al.*, 1977).

La parte reticulada de la SN presenta los tres tipos celulares mencionados. Las células grandes y medianas difieren sólo en tamaño, por lo que son reportadas como un sólo tipo, que constituye el 71 % de las neuronas examinadas. Las dendritas de las células grandes y medianas, que pueden localizarse en la región medio-lateral, tienden a dirigirse y ramificarse paralelamente al crus cerebri. En la región basal se ha observado otro tipo de neurona mediana-grande, la cual tiene un campo dendrítico que se extiende longitudinalmente, paralelo al crus

cerobri. La organización anterior le da un aspecto de laminación a la SN. Las dendritas de la parte reticulada no tienden a abandonar la región; sin embargo, las células cercanas a la parte compacta o a la parte lateral pueden tener su campo dendrítico en ambas regiones, pero no cursan grandes distancias. Los axones de las células grandes y medianas de la parte reticulada se originan del cuerpo celular o de una dendrita primaria, y aunque algunas no se ramifican, la mayoría presenta colaterales que se originan entre los 8 y 84 μ m partiendo del punto de origen del axón (Juraska *et al.*, 1977). En otro estudio se observó que los axones de células reticulares del gato pueden hacer autosinapsis exo-axonicas (autápticas o autosinápsis "autapses"; Karabelas y Purpura, 1980). Sin embargo, Grofova *et al.* (1962) han encontrado en preparaciones de Golgi que la SNr semeja una fina red de dendritas las cuales surgen de neuronas de SNr y SMC con relativamente pocos cuerpos celulares. En el mono y en la rata han sido reconocidas dos principales clases de neuronas: neuronas pequeñas las cuales son consideradas como interneuronas y neuronas grandes (Golgi del tipo I). La principal diferencia entre esas dos clases de neuronas no es el tamaño sino el arreglo de sus dendritas. Las neuronas pequeñas tienen dendritas cortas y delgadas las cuales no muestran ninguna orientación preferencial, mientras que las Golgi del tipo I tienen dendritas finas con campos dendríticos extensos.

Se ha establecido que las neuronas medianas y/o grandes son las que proyectan hacia el tálamo y/o hacia el colículo superior a través de axones colaterales que se originan en los dos tipos celulares (Juraska *et al.*, 1977; Bentivoglio *et al.*, 1979).

Sólo el 39% de las células está representado por las neuronas pequeñas con campos dendríticos de forma estrellada, consistente de 3 a 5 dendritas delgadas que generalmente se ramifican 1 o 2 veces y están restringidas a la parte reticulada; son semejantes a las pequeñas presentadas en la parte compacta (Juraska et al., 1977).

Las células de la parte compacta son principalmente de medio tamaño (15-20 μ m) (Dray y Straughan, 1976) y son aproximadamente el 50 % neuronas dopaminérgicas que proyectan de la parte compacta al estriado. Son semejantes a las que se presentan en la SNr y SNl pero pueden ser reconocidas por su patrón dendrítico caracterizado por 1 a 3 dendritas que se profundizan dentro de la SNr donde se ramifican una o dos veces; estas dendritas presentan varicosidades y corren paralelas a las dendritas de neuronas en la SNr. Las dendritas que llegan a la SNr desde la porción caudal o rostral de la SNc se orientan en dirección caudo-rostral o rostro-caudal respectivamente, mientras que las neuronas centrales de la SNc se orientan en dirección dorso-lateral (Juraska et al., 1977).

Las neuronas pequeñas se encuentran con una frecuencia menor, ya que se ha reportado un 15% de la población observada (Juraska et al., 1977). Son semejantes a las neuronas mencionadas en la parte reticulada.

En la SNl se pueden encontrar los tres tipos celulares antes mencionados. Las células grandes y medianas que difieren sólo en tamaño y frecuentemente proyectan sus dendritas dentro de la parte reticulada donde corren paralelas a la capa

peripeduncular. Los axones de las células grandes y medianas muestran una orientación inicialmente dorsal y/o medial (Juraska et al. 1977).

Neuroquímica de la Sustancia Negra

En la SN se han encontrado varios neurotransmisores putativos. Como se observa en la tabla 1 el neurotransmisor que alcanza mayor concentración en la SN es el GABA seguido de la glicina y la taurina.

TABLA 1. Posibles neurotransmisores y sus concentraciones en la SN.

Neurotransmisor	Concentración en la SN por g de tejido húmedo	
	HUMANO	RATA
GABA	5.3 μ molas	11.0 μ molas
GLICINA	2.3 μ molas	1.2 μ molas
TAURINA	1.2 μ molas	3.5 μ molas
5-HIDROXITRIPTAMINA	5.6 nmolas	10.9 nmolas
DOPAMINA	3.2 nmolas	9.1 nmolas
ACETILCOLINA	-	8.6 nmolas
SUSTANCIA P	0.37 nmolas	
NORADRENALINA	0.24 nmolas	

Tomado y adaptado de Dray y Straughan (1976).

CONEXIONES DE LA SUSTANCIA NEGRA.

La SN recibe aferencias principalmente de las siguientes estructuras:

Núcleo Estriado. A través de la vía estratonigral ipsilateral, neuronas GABAérgicas de mediano tamaño (de tipo espinoso) proyectan topográficamente desde la cabeza y cola del caudado-putamen hasta las regiones rostrales y caudales de la SN, respectivamente (Altar, 1967; Nagy *et al.*, 1976; Kitai *et al.*, 1979), viajando a través de la cápsula interna (Fallon y Moore, 1976). También se ha reportado la presencia de sustancia P (Nicos *et al.*, 1977). Este péptido coexiste con GABA según algunos autores (Scheel-Kruger *et al.*, 1981; Gesson *et al.*, 1982; Gerfen *et al.*, 1982; Kewel *et al.*, 1983) o puede originarse en distintas neuronas en regiones diferentes, según otros autores (Gale, *et al.*, 1977). Además, en dicha vía pueden encontrarse neuropéptidos de las familias de endorfinas y probablemente encefalinas (Herrera-Marschitz, 1984).

Núcleo globo pálido. A través de la vía pálido-nigral GABAérgica ipsilateral, que se origina en el segmento externo del globo pálido, esta estructura proyecta hacia la parte centro-dorsal de la SNr y la SNC (Gerfen *et al.*, 1982; Kandel, 1985; Bonilla, 1985; Smith y DeLong, 1980).

Núcleos del Rafe. El rafe se comunica con la SN por una vía ipsilateral del núcleo rafe dorsalis. Se reconoce que esta vía es serotoninérgica y además que la concentración de serotonina en SN es de las mayores en el cerebro (Palkovitz *et al.*, 1974; Dray *et al.*, 1976; Van der Kooij *et al.*, 1980; Gerfen *et al.*, 1982).

Corteza cerebral. Esta vía es aún controvertida; sólo se

supone en felinos y roedores, se origina de la corteza frontal ipsilateral y es de naturaleza glutamatergica (Gerfen *et al.*, 1982; Nauta y Domesick, 1984; Koernhuber *et al.*, 1984).

-Núcleo Pedúnculopontino. Esta estructura se comunica a través de acetilcolina con neuronas de la parte compacta de la SN, principalmente (Jackson, 1983; Clarke *et al.*, 1987).

-Sustancia negra. Existe una vía cruzada contralateral, que parece ser catecolaminérgica (Consoziane, 1985).

-Núcleo subtalámico. Esta estructura envía fibras de tipo glutamatergico que llega a la parte dorsal de la SNr y a al SNC (Fallon y Moore, 1978).

La SN proyecta sus eferencias principalmente a:

-Núcleo Estriado. A través de una vía dopaminérgica que se origina principalmente de neuronas localizadas en la SNC y en la región ventral de la SNr (Faul y Mehler, 1978). Existe evidencia de una vía no dopaminérgica que se origina principalmente en el VTA, la SNC medial y la SNr (Van der Kooy *et al.*, 1981).

-Núcleo Ventro-medial del Tálamo. A través de una vía GABAérgica que se origina principalmente en la región central de la SNr, que llega principalmente a los núcleos ventromedial e intralaminar (Kilpatrick *et al.*, 1981; Deniau y Chevalier, 1984).

-Colículo superior. A través de una vía GABAérgica que se origina principalmente en la región ventrolateral adosada al crus cerebri (York y Faber, 1977; Vincent *et al.*, 1978; Di Chiara *et al.*, 1982; Melis y Gale, 1983; Warron *et al.*, 1983; Chevalier *et al.*, 1984). Además se ha reportado la existencia de proyecciones colaterales desde la SN al estriado y el colículo superior a través de una vía dopaminérgica (Takada *et al.*, 1986a, 1986b).

-También han sido postuladas otras vías, entre las que están, el globo pálido, el núcleo parafascicular del talamo, el núcleo subtalámico, la formación reticular pontina y mesencefálica, el área gris central y periacueductal (Faull y Mehler, 1978; Grofova et al, 1982; Boyer et al, 1982; Deniau et al, 1982; Percivalle, 1987).

Faull y Mehler (1978) encontraron que existe una compartimentalización de las proyecciones de la SNr, en lo que denominaron subnúcleos, que serían los siguientes y que de manera esquemática son presentados en la figura 1 del trabajo enviado a publicación que forma parte de esta tesis (pag. 25 del manuscrito):

NT -Subnúcleo de neuronas de proyección talámica ó zona nigro-talámica.

NC -Subnúcleo de neuronas de proyección colicular ó zona nigro-colicular. *

NEr -Subnúcleo de neuronas de proyección estriatal ó zona nigro-estriatal reticular.

* En la figura 1 del manuscrito aparece NC que en ese caso representa a la nigra compacta.

Además, se ha encontrado que las vías nigro-talámica y nigro-colicular pueden originarse a partir de la misma neurona, de colaterales formadas dentro de la SNr (Faull y Mehler, 1978; Bentivoglio et al, 1979; Deniau et al 1982.). Asimismo, se ha encontrado evidencia de que la vía nigroestriatal (nigro-colicular) puede coproyectar al estriado a través de una vía dopaminérgica (Takada et al, 1980a, 1980b).

De los párrafos anteriores podemos concluir que en la SN confluye información motora tanto descendente como ascendente, y que la información resultante de la integración de dichas entradas es dirigida, asimismo, a varias regiones del SNC.

III. LA CONDUCTA DE GIRO.

Es de gran interés el hecho que sustancias que alteran a nivel sináptico la fisiología del sistema nervioso, como agonistas o antagonistas de receptores de neurotransmisores, puedan inducir un efecto a nivel conductual. Esto permite relacionar efectos bioquímicos con un fenómeno que se puede medir conductualmente, lo cual es de suma importancia para la investigación en las neurociencias.

Esta tesis se enfocó en el estudio de compuestos que actúan a nivel sináptico como el rojo de ruteno, la 4-aminopiridina y el muscimol -agonista GABAérgico "A" para inducir una conducta motora conocida como conducta de giro.

La conducta de giro es definida como un movimiento activo de un animal con dirección circular en respuesta a la alteración unilateral de la fisiología de una región determinada. Esta conducta está caracterizada por un giro de un diámetro menor que la longitud del animal y con su cola hacia el lado del giro; en algunos casos el animal puede girar usando solamente como pivote a las patas traseras (Pycock, 1969).

La dirección del giro está dada en relación al lado del cerebro que está siendo estimulado, lesionado eléctrica o químicamente o por extirpación de una región específica. La mayoría de los autores utilizan los términos **contraversivo** o **contralateral** al referirse al movimiento circular dirigido el lado opuesto del

sitio de experimentación, y los términos **ipsiversivo** o **ipsilateral** cuando el movimiento es hacia el mismo lado del sitio de experimentación (Fyock, 1980). De manera general podemos recordar la predicción de Ungerstedt, quien define que la dirección del giro es contralateral al estriado de mayor actividad dopaminérgica e ipsilateral al de menor actividad del sistema dopaminérgico (Ungerstedt, 1971).

ESTRUCTURAS CEREBRALES RELACIONADAS CON LA CONDUCTA DE GIRO.

Buenos modelos animales de la conducta de giro están basados en un desbalance de la estimulación del receptor de dopamina estriatal, y es aceptado de manera general que el núcleo caudado es el principal responsable de esta actividad motora. Las vías eferentes a través de las cuales el cuerpo estriado (núcleo caudado más el núcleo putamen) media la conducta de giro son de manera general desconocidas. Sin embargo, las más aceptadas van al globo pálido y a la SN. Las rutas eferentes del cuerpo estriado que al parecer están relacionadas con la conducta de giro son mostradas en la figura 1.

Como ya se ha mencionado, la conducta de giro puede ser producida en respuesta a la alteración unilateral de la actividad de las estructuras mencionadas en la figura 1. Dicha alteración puede ser producida de diferentes maneras:

- 1.- Por estimulación eléctrica,
- 2.- Por lesión electrofisiológica o extirpación y
- 3.- Por estimulación farmacológica.

La conducta de giro no sólo depende del núcleo que se afecte, sino también de la posición exacta dentro de éste, por lo que no

es sorprendente que los resultados reportados sean algunas veces contradictorios.

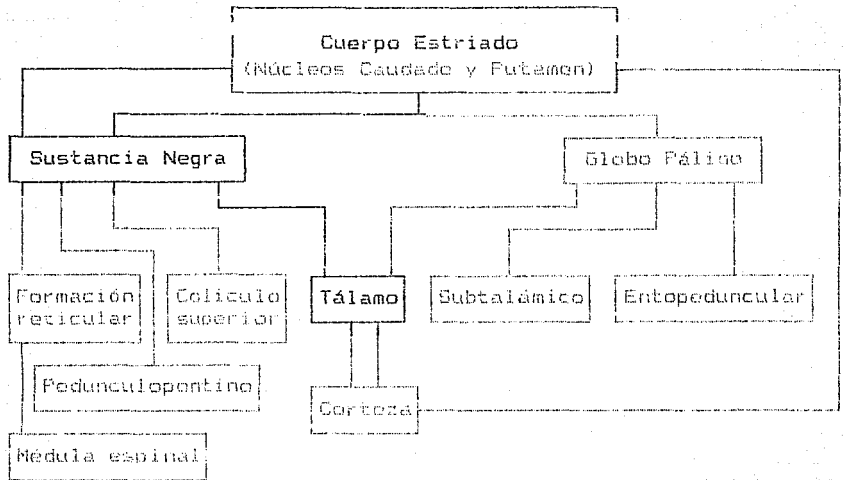


Fig. 1 Rutas eferentes del cuerpo estriado que están relacionadas con la conducta de giro. Las vías resaltadas serán tratadas en esta tesis. (Modificado de Pycocck, 1980).

NEUROTRANSMISORES Y LA CONDUCTA DE GIRO

DOPAMINA.

Experimentalmente es posible producir la destrucción de neuronas dopaminérgicas por acción de la neurotoxina 6-hidroxi dopamina (6-OHDA), la cual administrada por medio de una microjeringa, con ayuda de la tónica estereotáxica, en el haz del cerebro medio produce una destrucción específica de las neuronas dopaminérgicas (Ungerstedt, 1971). Después de la inyección de 6-OHDA en la vía nigroestriatal, las ratas manifiestan una conducta de giro ipsilateral, conducta que pronto desaparece, cuando los animales de experimentación "aprenden" a compensar el efecto de la lesión. Sin embargo, esta conducta puede presentarse

en sentido contralateral dos semanas después de la inyección como respuesta a la administración i.p. de apomorfin, un agonista dopaminérgico, que es explicada por Ungerstedt (1971) como un incremento de la sensibilidad de los receptores a dopamina (supersensibilidad) producida por una denervación.

Se ha propuesto que la dopamina liberada en la SN, desde las dendritas de neuronas dopaminérgicas de la parte compacta hasta la porción reticulada de la SN, tiene el papel de regular la actividad dopaminérgica NE a través de receptores presinápticos en las neuronas GABAérgicas estrato-nigrales (Nieuouillon *et al.*, 1979) (Fig. 2). De esta forma la dopamina mediante una

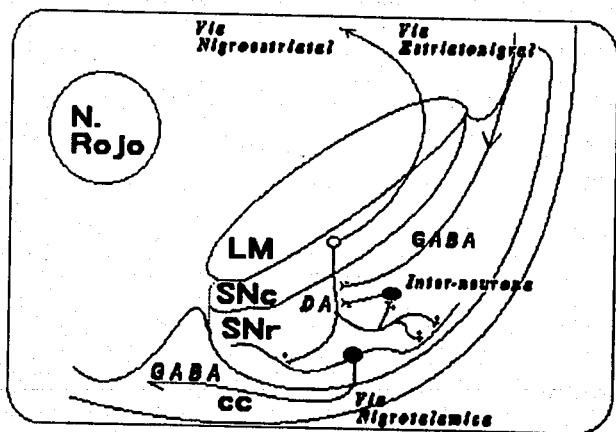


Fig. 2.- Esquema de las relaciones entre las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta con neuronas de la parte reticulada.

facilitación presináptica de la liberación de GABA produciría inhibición del sistema dopaminérgico NE. De la misma manera, la liberación facilitada de GABA, por la dopamina, inhibiría la liberación de sustancia P, inhibiendo la facilitación debida a este péptido. Además, estos mecanismos no excluyen la autorregulación dopaminérgica a través de autorreceptores situados en las mismas dendritas dopaminérgicas.

Cuando se aplican intranigralmente, a ratas con lesión por 6-OHDA, sustancias relacionadas farmacológicamente con la dopamina se pueden encontrar los resultados mostrados en la tabla 2.

Cuando se aplican intraperitonealmente agonistas dopaminérgicos a roedores, a los que se les ha practicado una extirpación ó electrolesión unilateral del cuerpo estriado ó la SN, se han encontrado los resultados en la conducta motora que son mostrados en la tabla 3; cabe mencionar que en ocasiones se han reportado resultados contradictorios en cuanto a la dirección del giro, pues esta puede ser ipsilateral o contralateral para un mismo fármaco; esto puede explicarse si se toma en cuenta el sitio exacto de lesión ó ablación.

Estudios de las conexiones de la SN sugieren que la conducta de giro es resultante de los cambios en la actividad del sistema estriatal dopaminérgico por una vía que parte del estriado a la SN, y de ésta al tálamo (García-Muñoz et al., 1983; Patiño y García-Muñoz, 1985).

Tabla 2.- Conducta de giro inducida por la administración intranigral de compuestos relacionados farmacológicamente con la dopamina en animales que recibieron una administración intranigral de 6 OHDA.

Substancia	Sentido
Anfetamina	Ipsilateral
Aponorfina	Contralateral
L-DOFA	"
Bromocriptina	"
LSD	"
Piribedil	"
ADTN	"
Ergocornina	"
Ergometrina	"
Lergotrila	"
Lisurida	"
Nomifensina	Ipsilateral
Mazindol	"
Fenciclidina	"
Amantadina	"

Tomado de Pycock, 1980.

Tabla 3.- Conducta de giro inducida por la administración intra-peritoneal de compuestos relacionados farmacológicamente con dopamina en animales que fueron lesionados por extirpación o electrolesión.

Substancia	Sitio de lesión	Sentido de rotación
Anfetamina	Estriado	Ipsilateral
	S. negra	Ipsilateral
Aponorfina	Estriado	Ipsilateral
	S. negra	Ipsilateral
	S. negra	Contralateral
L-DOFA	Estriado	Ipsilateral
	S. negra	Ipsilateral
Roserpina	Estriado	Contralateral
Bromocriptina	S. negra	Contralateral
Neurolepticos	Estriado	Contralateral
	S. negra	Contralateral
Fenciclidina	S. negra	Ipsilateral
Amantadina	S. negra	Ipsilateral
Nomifensina	S. negra	Ipsilateral
ET495	Estriado	Ipsilateral
	S. negra	Ipsilateral

Tomado de Pycock, 1980.

ACETILCOLINA.

Se ha encontrado que la acetilcolina puede inducir la conducta de giro en el estriado y la SN. A partir de este hallazgo, se ha postulado una relación entre dopamina y acetilcolina en el estriado para el control de la conducta motora (Pycock *et al.*, 1976, 1980; De Montis *et al.*, 1979; Lehman y Langer, 1983; James y Massey, 1978; Sandberg *et al.*, 1984).

Se han realizado experimentos en los que se inyectaron agonistas y antagonistas de acetilcolina a ratas con una previa destrucción de la vía dopaminérgica nigro-estriatal, así como la inyección de dichas drogas en diferentes sitios de los ganglios basales de diferentes especies (Tabla 4).

A partir de los estudios en los cuales las drogas fueron administradas sistémicamente, se observó que las drogas anticolinérgicas aumentan la conducta de giro en roedores con previa lesión de la vía dopaminérgica nigro-estriatal, mientras que los agentes colinérgicos la reducen (Pycock *et al.*, 1977; Pycock, 1980).

SEROTONINA.

En vista de las relaciones anatómicas y bioquímicas de los núcleos del rafe con la vía nigroestriatal, se ha observado que estos núcleos ejercen un efecto inhibitorio sobre dicha vía (Pycock, 1980). Además, en la SN existe una de las mayores concentraciones de serotonina registrada en el cerebro (Dray y Straughan, 1976).

Tabla 4. Conducta de giro inducida por la administración intracerebral de agonistas o antagonistas de acetilcolina en varias especies de experimentación.

Sitio	Especie	Droga	Dirección de asimetría o rotación		
Núcleo caudado	Rata	Arecolina	Ipsilateral		
		Neostigmina	"		
		Carbacol	Contralateral		
		Atropina	"		
		(+)-Tubocurarina	"		
	Conejo	DFF	"		
		Carbacol	"		
Sustancia negra	Rata	Atropina	Ipsilateral		
		Arecolina	Ipsilateral		
		Carbacol	"		
		Atropina	-		
		Escopolamina	Contralateral		
	Conejo	Hemicolinio	"		
		Carbacol	Ipsilateral		
		"	Ipsi/contra		
		Globo pálido	Rata	Arecolina	Ipsilateral
			Atropina	Contralateral	

Tomado de Pycock, 1980.

GABA

Ha sido ampliamente demostrada la inducción de la conducta de giro por alteración de la vía estriatonigral, la cual media su acción a través de GABA (Scheel-Krüger *et al.*, 1981). Asimismo se ha probado una larga serie de agentes agonistas de sistemas GABAérgicos como el muscimol, etanolamina-oxi-sulfato y ácido imidazol acético, y en la mayoría de los casos se ha reportado la inducción de giro contralateral (Scheel-Krüger *et al.*, 1977, 1981; Olpe *et al.*, 1977; Reavill *et al.*, 1979; Martin *et al.*, 1976; Pycock, 1980), producido por la administración intranigral de estos compuestos, mientras que la inyección de antagonistas de GABA produjo giro ipsilateral (Reavill *et al.*, 1979; Scheel-Krüger

et al. 1977; 1981; Olpe et al. 1977; Fycock, 1980). Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados en la SN muestran contradicciones, las que al parecer son debidas a las diferencias en el sitio exacto de inyección (Reavill et al. 1979; James y Collingridge, 1977 y; Kilpatrick y Starr, 1981).

La concentración de GABA en el cerebro es de 200 a 1000 veces mayor que la concentración de dopamina, norepinefrina, acetilcolina o serotonina. Se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central; la mayor concentración de GABA ha sido encontrada en la SN, como se muestra en la tabla 5.

También ha sido demostrada la presencia de GABA en otras vías relacionadas con la conducta de giro, como la región tectal (colículo superior), a través de la vía nigrotectal (Vincent et al. 1978); en la vía nigro-talámica (núcleo ventromedial) (Kilpatrick et al. 1981; Gauchy et al. 1983; Zainos et al. 1984; Chevalier et al. 1985); y en el núcleo caudado de gato (Kemel et al. 1983).

Aparte de los neurotransmisores antes mencionados, también se ha reportado que algunos péptidos como la sustancia P (Olpe y Koella, 1977; James y Starr, 1979; Somogyi et al. 1982), la endorfina A y las encefalinas (Herrera-Marschitz et al. 1984) inducen la conducta de giro al inyectarse en la SN. Además se ha reportado un papel de la acetilcolinesterasa no relacionado con la función colinérgica ya conocida. (Erckenfeld et al. 1984).

Tabla 5.- Distribución de GABA en el cerebro de los mamíferos.

Región cerebral	GABA (µmoles/g peso húmedo)		
	Mono Rhesus	Conejo	Rata
Sustancia negra	9.70	8.50	10.07
Globo pálido	9.54	8.43	7.63
Hipotálamo	6.19	5.33	7.63
Taberoulas cuadrígeminas (T.C.)			
inferiores	4.75	3.06	5.06
Núcleo dentado	4.30	4.09	-
T. C. superiores	4.17	4.93	7.67
Núcleo oculomotor	-	4.52	-
Fúsculo	3.62	3.48	3.58
Tegmento pontino	3.34	1.82	3.34
Núcleo caudado	3.20	3.48	3.58
Hipocampo	-	2.39	3.58
Corteza occipital	2.68	-	-
Tegmento medular	2.27	2.76	2.11
Corteza frontal	2.10	2.10	2.86
Corteza motora	2.09	-	-
Corteza cerebelosa	2.03	1.80	3.01

Tomado de Bonilla, 1985.

OBJETIVOS

Con base en los antecedentes revisados, en los cuales es evidente el papel del Ca^{2+} sobre la función sináptica, así como la alteración de su acción por el RRU y la 4AP, el objetivo de la presente tesis fué estudiar el efecto de la administración intranigral del RRU y la 4AP sobre la conducta motora de las ratas, así como de establecer el mecanismo de acción de estas sustancias a través del cual la conducta de giro es inducida.

Para este propósito nos planteamos la siguiente hipótesis:

En virtud de que una disminución en la actividad de la proyección GABAérgica estratonigral se traduce conductualmente como giro en dirección ipsilateral, esperamos que el RRU, al inhibir la liberación de GABA en ésta terminal, induzca ésta misma conducta. Por el contrario, si una activación de este sistema de neurotransmisión produce un giro en dirección contralateral, entonces esperamos que la facilitación de la liberación del neurotransmisor GABA, desde la terminal estratonigral por la 4AP, se manifieste conductualmente como giro con dirección contralateral.

RESULTADOS

Los resultados serán presentados en dos fases:

I.- La primera fase consta de los resultados integrados para su publicación en el trabajo titulado "Circling behavior induced by intranigral administration of ruthenium red and 4-aminopyridine in the rat", junto con una gráfica que no es mostrada en el trabajo pero que se es mencionada en el texto.

II.- La segunda fase consta de los estudios posteriores a la preparación del manuscrito mencionado en la fase I.

I.- ESTUDIOS POSTERIORES A LA PREPARACION DEL MANUSCRITO ENVIADO A REVISION PARA SU PUBLICACION.

"Circling behavior induced by intranigral administration of methenium red and 4-amino-pyridine in the rat"

En este trabajo se realizaron los siguientes estudios:

A.- Efecto de la administración unilateral intranigral RRu y la 4AP sobre la conducta motora comparados con el efecto producido por la administración intranigral de muscimol en este mismo sitio.

Para este estudio, al igual que para los posteriores, utilizamos ratas tipo Wistar machos de 175 ± 5 g de peso, las que fueron anestesiadas con halotano en oxígeno y, que con ayuda de un marco estereotáxico, se les administró unilateral e intranigralmente el RRu, la 4AP o el muscimol en las coordenadas y las dosis siguientes:

	NT (A -5.2, L 1.7, D 7.8)	NE: (A -5.6, L 1.6, D 8.0)
RRu	1.4 nmolas/0.2 μ l	0.7 nmolas/0.1 μ l
4AP	10.4 nmolas/0.2 μ l	5.2 nmolas/0.1 μ l
Muscimol	0.35 nmolas/0.2 μ l	0.175 nmolas/0.1 μ l

En el caso de la 4AP y el muscimol, el solvente (solución salina) incluyó 6 mg/ml del colorante inerte, azul directo (direct blue 15).

En este estudio encontramos que el RRu, la 4AP y el muscimol, inducen la conducta de giro. Sin embargo, la dirección del giro depende del sitio exacto donde es administrada la sustancia; así mientras los tres compuestos producen un giro con dirección contralateral al sitio de inyección cuando estos son administrados en NT, el RRu y la 4AP lo inducen en dirección ipsilateral y el muscimol contralateral al sitio de inyección cuando estos son inyectados en NEr (Ver Fig 2 y 4 del artículo enviado a revisión para su publicación). Además, los efectos temporales de estos compuestos varían en gran manera, ya que el efecto del rojo de rutonio es mantenido por más de 3 días, después de los cuales el efecto prácticamente desapareció. Para el caso del muscimol y la 4AP, estos inducen un efecto conductual que desaparece dentro de las primeras 3 horas y 60 minutos, respectivamente.

B.- Efecto del pretratamiento con el antagonista al receptor dopaminérgico (D_1 - D_2), el haloperidol, sobre la conducta de giro inducida por el RRu en NT y NE de la SN.

Con el objeto de conocer el posible papel de neuronas dopaminérgicas en la conducta de giro inducida por RRu y muscimol, a algunos grupos se les inyectó haloperidol (0.1mg/kg, i.p.) 15 minutos antes de la administración unilateral del RRu o del muscimol. Las coordenadas de inyección y las dosis empleadas son las empleadas en el primer estudio (A.-).

El pretratamiento con haloperidol completamente abolió el giro ipsilateral inducido por el RRu administrado en NEr (Ver tabla 1 del trabajo enviado a revisión). En contraste con este

resultado la conducta de giro inducida por la administración de RRu en NT no fué significativamente alterada por el pretratamiento con el neuroléptico. Por otro lado, el pretratamiento con haloperidol tuvo poco efecto sobre la conducta de giro inducida por el muscimol administrado en NT (ver tabla 2 del trabajo enviado a publicación).

C.- Efecto de la inyección intranigral del RRu sobre la liberación de [3 H]GABA estimulada por alto potasio (HK^+) de rebanadas de SN.

La liberación de [3 H]GABA de rebanadas de SN microinyectada con RRu fue estudiada en 17 ratas. La depolarización con potasio (47 mM) resultó en un incremento del 270-285% con respecto a la liberación basal, tanto en las SNs inyectadas con RRu como en los controles (ver gráfica 2 de esta tesis a continuación del trabajo enviado a publicación), indicando la falta de efecto del RRu sobre la liberación de [3 H]GABA.

Además de los estudios antes mencionados, en el trabajo se presentan microfotografías de la apariencia de la región NT teñida in vivo por la administración intranigral de RRu (Fig. 5. del trabajo enviado).

Trabajo enviado a publicación en la revista Neuroscience.

CIRCLING BEHAVIOR INDUCED BY INTRANIGRAL ADMINISTRATION OF
RUTHENIUM RED AND 4-AMINOPYRIDINE IN THE RAT.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura no incluida en el manuscrito enviado a publicación y estudios adicionales.

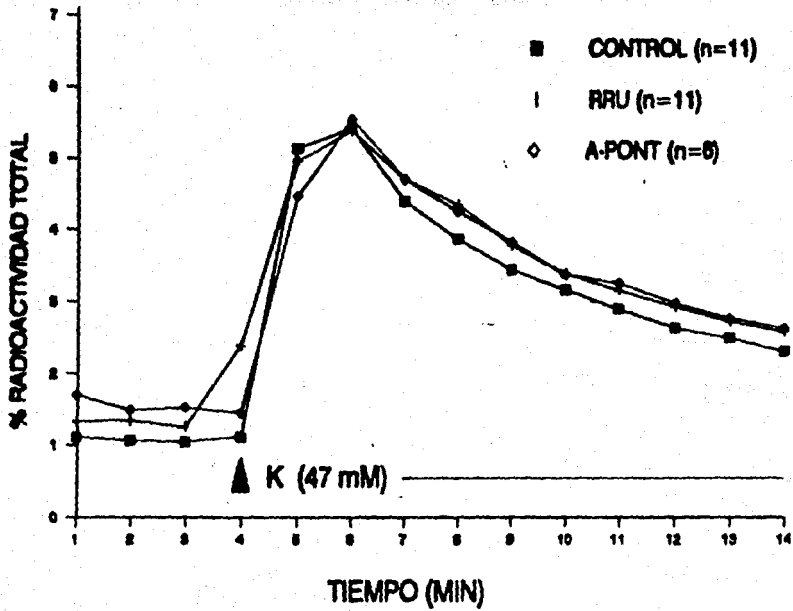


Fig. 3 Efecto del RRU sobre la liberación de [3 H]-GABA en experimentos ex vivo.

CIRCLING BEHAVIOR INDUCED BY INTRAMIGRAL ADMINISTRATION
OF RUTHENIUM RED AND 4-AMINOPYRIDINE IN THE RAT

Ricardo Tapia and Jorge Flores-Hernández

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600,
04510-México, D.F., México

Correspondence and proofs to: Ricardo Tapia, Departamento de
Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad
Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600,
04510-México, D.F., México

Tel. (905) 550-5215 ext. 4935

Fax (905) 548-0387

Abbreviations: 4-AP, 4-aminopyridine; GABA, γ -aminobutyric acid;
RuR, ruthenium red.

Running title:

Effects of intranigral ruthenium red and 4-aminopyridine

Abstract We have studied the effects of the unilateral intranigral microinjection of RuR and 4-AP, as compared with that of muscimol. The three drugs produced contralateral turning when injected into the central nigra reticulata. Muscimol was the most effective but its effect disappeared in 3-4 h, whereas that of RuR lasted for up to 3 days. When injected into the caudoventromedial nigra, RuR produced intense ipsiversive turning, 4-AP weak ipsiversive turning and muscimol intense contraversive turning. Pretreatment with haloperidol (1.p.) abolished the effect of RuR after injection into the caudoventromedial nigra but only partially reduced it after Administration into the central nigra. The effect of muscimol, when injected into either of the nigral regions studied, was only slightly diminished by haloperidol. The release of [3 H]-dopamine in slices of the RuR-injected substantia nigra was not altered. Histological examination showed that the microinjected RuR was located mainly inside the soma of nigral neurons.

It is concluded that alterations of transmitter release are probably responsible for the circling behavior induced by 4-AP, but the effects of RuR seem to be secondary to its penetration into the neuronal somas. Dopaminergic neurons seem to play an important role in the ipsilateral turning induced by RuR when injected into the caudoventromedial nigra.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

The release of neurotransmitters from presynaptic terminals is a central event in synaptic transmission. This phenomenon has been extensively studied, both in the peripheral and in the central nervous system, and it is generally accepted that calcium ions play an essential role in triggering transmitter release¹⁰. In the present work we have used two drugs capable of modifying transmitter release, the inorganic dye ruthenium red (RuR) and 4-aminopyridine (4-AP), to study their effect when injected directly into the substantia nigra. These drugs have been found to exert potent effects on motor behavior that can be ascribed to their actions on neurotransmitter release. Thus, the i.p. administration of RuR produces flaccid paralysis in mice and cats, whereas its intracerebral injection results in convulsions^{23,24}. On the other hand, RuR preincubated in vitro with synaptosomes inhibits the depolarization-stimulated uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Refs. 1,23), as well as the Ca^{2+} -dependent release of γ -aminobutyric acid (GABA) and acetylcholine^{22,24,25}. The effects of RuR in vivo have therefore been interpreted as due to an inhibition of the release of acetylcholine at neuromuscular junctions after its i.p. injection and of GABA after its intracerebral administration. In agreement with this interpretation, we have also shown that the RuR-induced paralysis was rapidly and completely antagonized by systemic administration of drugs that stimulate the release of transmitters, such as 4-AP and guanidine^{22,23}. In synaptosomes, 4-AP is capable of inducing the release of GABA and acetylcholine in a Ca^{2+} -dependent manner and

this effect is partially antagonized by RuR^{17,20}.

In view of the above findings, it was considered of interest to study the behavioral effects of the injection of 4-AP and RuR directly into discrete areas of the brain. The rat substantia nigra is a crucial component of the striatonigral pathway involved in the control of movements, and the numerous GABAergic synapses present in this structure play an essential role in such control. Drug-induced inhibition or stimulation of the function of these synapses in the substantia nigra compacta and in different zones of the reticulata have been related to the stereotyped movements shown by the treated animals^{10,11,17,20}. Therefore, in the present experiments this region was chosen as the target of the action of RuR and 4-AP. Muscimol was also administered for comparative purposes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and stereotaxic injections

Adult male Wistar rats of 175-200 g weight were used in all experiments. Animals were anesthetized with halothane in oxygen, immobilized in a stereotaxic Kopf instrument and injected unilaterally into one of two areas of the substantia nigra reticulata: the central part whose axons project mainly to the thalamus, or the caudovertebral region projecting to the striatum^{7,21}. According to this anatomical description, these areas will be subsequently called in this paper nigrothalamic and nigrostriatal (Fig. 1). Their stereotaxic coordinates,

derived from König and Klippel¹² and using bregma as reference point, were, respectively, A -3.2, L 1.7, D 7.8, and A -3.6, L 1.6, D 8.0. Drugs were injected at the doses indicated under Results, dissolved in water or isotonic saline. The volume injected was 0.2 μ l (nigrothalamic region) or 0.1 μ l (nigrostriatal region); the duration of the injection was 3-5 min, using a 0.5 μ l or 1 μ l Hamilton syringe held in a manual Kopf injector mounted on the stereotaxic frame. In some animals the dopamine antagonist haloperidol was injected i.p. before RuR or muscimol administration.

Anesthesia was disconnected immediately after the end of the injection period and suture of the skin, and rats were observed and/or videofilmed during 3-4 h. Some rats were also observed during 30 min periods in the next days after the injection.

Localization of intracerebral injection

In all animals used, at the end of the experimental period brains were removed and frozen for later histological localization of the site of injection, in 40 μ m thick tissue sections obtained in a cryostat. Since RuR is a dye itself, when this drug was used site localization was easy. When 4-APF or muscimol was injected, pontamine blue (direct blue 13) was also present in the solution (5 mg/ml) in order to locate the site injected more precisely than looking for the tip of the needle track. Several control animals were injected with a solution containing only this dye, in both areas of the substantia nigra studied, and in no case was any behavioral alteration observed.

thus discarding that the effects of the drugs may be due to the damage produced by the needle or to the volume of vesicle administered.

In some experiments the brain of the rats injected with RuR was frozen and sectioned in a cryostat as above, but sections were dehydrated with graded ethanol and xylol, covered with a glass slide and observed at various magnifications without further staining. With pentaxine blue this procedure resulted in a considerable loss of the staining.

^3H GABA release

In another series of experiments, the substantia nigra of the animals injected with RuR was dissected out on ice, sliced (200 μm thickness) in a McIlwain tissue chopper and incubated with ^3H GABA in order to study the release of this transmitter. The incubation conditions and superfusion system for measuring labeled GABA release were as previously described^{13,16}, in the presence of 0.1 mM aminooxyacetic acid in order to block GABA metabolism. The basal release and the release stimulated by depolarization with 47 mM K^+ was studied¹⁶. In these experiments the substantia nigra of the non-injected side was handled in parallel and served as control.

Drugs

RuR, 4-AP, haloperidol, muscimol and direct blue 15 were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). RuR dose was calculated for the pure compound. ^3H GABA (spec. act. 44 Ci/mmol) was obtained from New England Nuclear (Boston, MA).

RESULTS

Effects on motor behavior

RuR. Immediately after recovery from anesthesia (5-10 min), the animals injected with 1.4 μ mol of RuR into the nigrothalamic region of the substantia nigra showed a characteristic position, with the body and the tail bent to the side contralateral to the injection. This was followed by typical circling movements towards the contralateral side, which were not continuous but interrupted by periods of immobility. The circles were of short radius and were usually accompanied by a peculiar lifting and extension of the head towards the side opposite to the movement of the body. Occasionally this was followed by lifting and clonic contractions of the contralateral forelimb and by a very rapid isolated barrel turning of the body, around the head to tail axis, ipsilateral to the injected side. The latter behavior was more frequently observed when the injection site included part of the substantia nigra compacta.

In contrast to the effects of RuR injected in the nigro-thalamic region, when 0.7 μ mol of this dye was administered into the nigrostriatal zone the rats showed body bending, as well as circling movements, but towards the ipsilateral side; the head, however, was continuously directed towards the contralateral side. Occasional clonic movements of the contralateral forelimb were also present, as after the nigrothalamic injection. The ipsilateral turning was not identical to the contralateral one described above. Whereas the

latter involved walking of the animal, using all four limbs, the former was characterized by tight circles in which the hindquarters remained almost motionless. Barrel turning was not observed.

In some rats in which the main site of RuR injection (1.4 μ mol) was located between the nigrothalamic and nigrostriatal zones, the direction of the circling was variable. The rats started to turn contraversively but after several min they stood up on their rearlimbs and switched to ipsilateral turning.

When the RuR injection placement comprised part of the medial lemniscus, the rats showed running fits and generalized tonic-clonic convulsions at variable times after the injection. In contrast to these effects, when the site of injection was ventral to the substantia nigra, in the crus cerebri, no behavioral alterations were observed.

The circling behavior produced by the intranigral administration of RuR is shown quantitatively in Figs. 2-4. The contraversive turning after injection into the nigrothalamic zone increased slowly up to 5-6 turns/min in the first 30 min after recovery from anesthesia (Fig. 2). This effect was of long duration, since at 29 and 44 h after the injection the frequency of contralateral turns was still 60% and 31%, respectively, of that observed at the peak of the effect. After 50 h the circling practically disappeared, although some turns were still observed even after 3 days (Fig. 3).

The ipsilateral rotation observed after RuR injection in the nigrostriatal region took 20 min to appear, increased progressively during the next hour and reached more than 20 turns/min at 70-80 min after recovery from anaesthesia (Fig. 3).

Six rats were injected bilaterally with RuR in the nigrothalamic region. These rats did not show any alteration in body posture, but the head remained in hyperextension and alternate clonic contractions of the right and left forelimbs were observed during at least one h. These were accompanied by occasional brief periods of generalized rigidity.

4-AP. The effect of the intranigral administration of 4-AP is shown in Figs. 2 and 4. When injected into the nigrothalamic region at a dose of 10.4 nmol this drug produced contralateral turning quantitatively and qualitatively similar to that induced by RuR, except that the rats did not show the extension of the head nor the barrel turning; the duration of the effect was much shorter than in the case of RuR, since it disappeared completely at about 60 min after the injection (Fig. 2). The administration of 4-AP (5.2 nmol) into the nigrostriatal region resulted in a moderate ipsilateral turning, almost negligible as compared to that of RuR, which disappeared in less than 45 min (Fig. 4).

Higher doses of 4-AP were tested in some rats. Thirty and 90 nmol of this drug injected in the nigrothalamic region resulted in higher frequency of contraversive circling but accompanied by clonic-tonic movements of the contralateral

forelimb, frequent and violent barrel turning, and jumps.

Muscimol. The administration of muscimol into both the nigrothalamic (0.15 nmol) and nigrostriatal (0.175 nmol) regions resulted in notable contraversive turning behavior (Figs. 3 and 4). In contrast to the effects of RuR, no alterations in the position of the head, nor barrel turning or forelimb abnormal movements, were observed in these animals. The time course of the increase in turning behavior, as well as its intensity, were similar to those observed after the nigrostriatal injection of RuR. However, the duration of the effect was much shorter, since it started to decline at about 60 min after the injection and disappeared almost completely at 3-4 h (results not shown; 5 rats were observed up to 6 h after muscimol injection).

Effects of pretreatment with haloperidol. In order to obtain information on the possible involvement of dopaminergic neurons in the circling behavior induced by RuR and muscimol, some groups of rats were injected i.p. with haloperidol (0.1 mg/kg) 15 min before the unilateral intranigral administration of the drugs, at the doses indicated above. This pretreatment has been shown to abolish or diminish the dopamine-dependent turning¹¹.

Haloperidol pretreatment completely abolished the ipsiversive turning induced by RuR administration into the nigrostriatal region (Table I). However, in these rats the head remained constantly oriented towards the contralateral side, as in the case of the RuR-treated animals not injected with

haloperidol. In contrast to this notable effect, pretreatment with the dopamine antagonist affected only partially the contralateral turning observed after RuK injection into the nigrothalamic region (Table 2). In this case the number of turns was decreased by about 45% but only during the first 30 min after the injection of the dye, whereas no significant differences were observed at later time periods, as compared to the naive rats (Table 2).

Haloperidol pretreatment had also some effects on the turning behavior induced by muscimol, but these were, as in the case of the nigrothalamic RuK administration, only partial. The number of contralateral turns observed in the first 30 min decreased by 44-47% and this effect disappeared progressively in the next 60 min, after muscimol injection into both the nigrostriatal and the nigrothalamic zones (Tables 1 and 2).

Localization of injection sites

As implied in the previous section, the motor behavior of each treated animal was always correlated with the location of the drug injected, as observed in wet cryostat sections.

An example of the histological appearance of the nigrothalamic region of the substantia nigra injected with 1.4 nmol of RuK, in dehydrated tissue sections, is shown in Fig. 5. There was a strikingly circumscribed location of the dye just on neuronal bodies, with fibers and ramifications being only slightly stained. At higher magnification some intracellular organelles, particularly the nucleolus, were clearly stained. 2 h

after the microinjection of RuR (Fig. 5B), indicating that at this time the dye had entered into the cell. It is also noteworthy that the staining remained even after the dehydration procedure to which the sections were subjected. In contrast, when the nigra was injected with solutions containing propidium blue most of the staining disappeared from the sections and the remainder was either located on a few cells or no specific stained structures could be identified.

^{14}C GABA release

The release of labeled GABA from slices of the substantia nigra microinjected with RuR was studied in 17 rats. Depolarization with 47 mM K^+ resulted in a 270-295% peak stimulation of release, both in the injected nigra and in the control non-injected nigras (results not shown), indicating a lack of effect of RuR microinjection on this parameter. The release curves were in both cases very similar to those previously described for glycine in cerebellar tissue¹⁴.

DISCUSSION

The results of the present experiments indicate that both RuR and 4-AP produce immediately turning behavior when administered in the substantia nigra. Although clearly we cannot assure that the drugs affect specifically the neurons projecting to the thalamus or to the striatum when injected into the nigrothalamic or nigrostriatal regions, respectively, it is particularly interesting that the injection of RuR into the former resulted in contralateral turning, whereas the

administration into the latter produced ipsilateral turning. These results are similar to those described with lictanus toxin, another drug known to inhibit GABA release^{2,8}, and therefore suggest that the turning behavior induced by RuR might be due to a decreased intranigral GABAergic transmission. However, the results of the experiments with muscimol argue against this mechanism. In fact, muscimol, a GABA agonist, also produced intense contraversive turning when injected in the nigrothalamic region, although its effect in the nigrostriatal zone was opposite to that of RuR. It is also interesting that the circling behavior induced by RuR was usually accompanied by other motor abnormalities, whereas that produced by muscimol was devoid of them. This points out the possibility that muscimol action is mainly, if not entirely, due to its GABAergic action, whereas in the case of RuR most probably other transmitters are affected and/or the dye has some other effect, such as a direct excitation of neuronal somas (see below). The contraversive turning produced by muscimol when injected in the two regions of the substantia nigra was similar to results described previously¹¹.

The involvement of an action of RuR different from its effect on transmitter release is supported by the results of the experiments with 4-AP. According to the hypothesis mentioned in the Introduction, one would expect that this drug, which induces an increase in the release of GABA and other transmitters, and behaves as an antagonist to RuR, both in vivo and in vitro^{22,23}, should produce turning behavior in the direction opposite to

that induced by RuR. This expectation was not fulfilled, since the direction of the rotation produced by 4-AP was the same as that after RuR, when injected in the two regions of the substantia nigra tested. Since the injected RuR was found inside neuronal bodies, and no effect on SABA release was observed in slices of the RuR-injected nigra, it seems reasonable to conclude that, whereas the action of 4-AP might be due to alterations in the release of more than one transmitter, that of RuR might be secondary to its penetration into neurons, which might result in their excitation. Since the final behavioral effect is notably dependent on the zone of the substantia nigra affected, it may be concluded, in agreement with other studies^{4,20}, that the distribution and function of transmitters vary greatly inside this structure, and/or that the nigrofugal neurons that participate in the turning behavior are different among the nigral zones. The type of turning behavior observed after RuR administration, as well as the position of the head pointing towards the side opposite to the circling direction, argue in favor of a deficient functioning of SABAergic nigrofugal neurons projecting to the thalamus and to the superior colliculus, since disinhibition in these two areas results in head orientation independent of the turning direction.^{8,10,17,27} Experiments are in progress in our laboratory to investigate the possible participation of these structures in the motor behavior induced by RuR.

Our results on the effect of haloperidol on muscimol-induced circling indicate a limited participation of dopaminergic

neurons in both regions of the nigra injected, since a clear reduction in the number of turns was observed only in the initial 30 min after the microinjection. These observations agree only partially with previous reports in which like turning behavior induced by muscimol when injected in the central nigra was notably reduced by haloperidol pretreatment, whereas when it was injected in more ventral areas the circling was not affected¹¹. The reasons for this discrepancy are not clear, but differences in the region injected is a distinct possibility. On the other hand, our experiments with RuR in haloperidol-treated rats clearly indicate that dopaminergic nigrofugal neurons are involved in the effect of the eye when injected into the nigrostriatal zone, since the ipsiversive circling was abolished. This ipsilateral turning produced by RuR could be due to an inhibition of the dopaminergic nigrostriatal neurons of the compacta, consequent to the excitation by RuR of the reticulata inhibitory GABAergic cells which inhibit such dopaminergic neurons^{6,7}, probably through axon collaterals⁷. As already discussed, in the case of the nigrothalamic region the involvement of the nigrothalamic pathway in the contralateral turning seems more probable.

Since we have previously found that labeled GABA release was decreased in synaptosomes isolated from mice previously injected intracisternally with RuR¹⁵, it was unexpected that we were unable to detect differences in GABA release between the control and the RuR-treated tissue. As already mentioned, a possible explanation is that after the

injection in the tissue RuR is able to penetrate rapidly into the cell somas, where it exerts effects different from inhibiting transmitter release. Such penetration of RuR into the cells was surprising, since studies in vitro have shown that this dye rapidly binds to nerve membranes and does not readily permeate it^{14,24}. Since the behavioral effects of RuR are of extremely long duration as compared with those of 4-AP or muscimol, it seems probable that RuR produces neuronal damage. In fact, preliminary electron microscopic observations from our laboratory indicate vacuolization of the neuronal somas containing RuR.

In conclusion, our findings indicate that, although the starting hypothesis that RuR might produce behavioral alterations as a consequence to the inhibition of transmitter release is most probably incorrect, its regional microinjection, as well as that of 4-AP, is a useful tool to gain important information on the role of discrete neuronal populations in certain behavioral or physiological parameters in the living animal.

Acknowledgments: This work was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (project P22000Y-880370), México, D.F. The participation of Patricia Salazar in the experiments on GABA release is gratefully acknowledged.

1. Ariza C. and Tapia R. (1984) Differential calcium-dependence of γ -aminobutyric acid and acetylcholine release in mouse brain synaptosomes. J. Neurochem. 47, 396-404.
2. Collingridge G.L., Collins G.G.S., Davies J., James T.A., Neal M.J. and Longbroach P. (1980) Effect of tetanus toxin on transmitter release from substantia nigra and striatum *in vitro*. J. Neurochem. 34, 540-547.
3. Deniau J.M. and Chevalier G. (1985) Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. II. The striato-nigral influence on thalamocortical cells of the ventromedial thalamic nucleus. Brain Res. 334, 227-233.
4. Dray A. (1977) The striatum and substantia nigra: a commentary on their relationships. Neuroscience 4, 1407-1439.
5. Faull R.L.H. and Mehler W.R. (1978) The cells of origin of nigroreticular, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat. Neuroscience 3, 909-1002.
6. Grace A.A. and Bunney B.S. (1979) Paradoxical 5HT₂ excitation of nigral dopaminergic cells: indirect mediation through reticulata inhibitory neurons. Eur. J. Pharmac. 59, 211-218.
7. Grace A.A. and Bunney B.S. (1983) Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell activity. Brain Res. 333, 271-284.
8. James T.A. and Collingridge G.L. (1977) Rapid behavioural and

- biochemical effects of tetanus toxin microinjected into the substantia nigra: a dual role for GABA?. Neurosci. Lett. **11**, 205-208.
7. Juraska J.M., Wilson C.J. and Ervovs P.H. (1977) The substantia nigra of the rat: a Golgi study. J. Comp. Neurol. **172**, 595-603.
10. Kilpatrick I.C., Collingridge G.L. and Starr M.S. (1982) Evidence for the participation of nigroreticular terminalbutyrate-containing neurones in striatal and nigral-derived circling in the rat. Neuroscience **7**, 207-222.
11. Kilpatrick I.C. and Starr M.S. (1981) Involvement of dopamine in circling responses to succinyl depends on intranigral site of injection. Eur. J. Pharmac. **69**, 407-419.
12. König J.F.R. and Klippel R.A. (1963) The Rat Brain: A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem. Williams and Wilkins, Baltimore.
13. López-Colomé A.M., Salceda E., Posantes-Norales H. and Tapia R. (1978) K^+ -stimulated release of labeled GABA, glycine and taurine in slices of several regions of rat central nervous system. Neuroscience **3**, 1069-1074.
14. Luft J.H. (1971) Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. Anat. Rec. **171**, 369-416.
15. Neza-Ruiz G. and Tapia R. (1978) 1^3 IGABA release in synaptosomal fractions after intracranial administration of

- ruthenium red. Brain Res. 154, 163-166.
16. Morales E. and Tapia R. (1987) Neurotransmitters of the cerebellar glomeruli: uptake and release of labeled aminobutyric acid, glycine, serotonin and choline in a purified glomerulus fraction and in granule layer slices. Brain Res. 420, 11-21.
17. Pycock D.G. (1980) Turning behaviour in animals. Neuroscience 5, 441-514.
18. Rubin R.P. (1982) Calcium and Cellular Secretion. Plenum Press, New York.
19. Starr M.S. and Summerhayes M. (1983) Role of the ventromedial nucleus of the thalamus in motor behaviour-I. Effects of focal injections of drugs. Neuroscience 10, 1157-1169.
20. Starr M.S., Summerhayes M. and Kilpatrick I.C. (1983) Interactions between dopamine and γ -aminobutyrate in the substantia nigra: implications for the striatonigral output hypothesis. Neuroscience 9, 547-559.
21. Takada M., Li I.K. and Hattori T. (1985) Collateral projection from the substantia nigra to the striatum and superior colliculus in the rat. Neuroscience 25, 563-568.
22. Tapia R. (1982) Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in mice by 4-aminopyridine, guanidine and lanthanum. Neurosci. Lett. 30, 73-77.
23. Tapia R. (1983) Effects of drugs on neurotransmitter

releases: experiments in vivo and in vitro. Neurosci. Biobehav. Rev. 9, 391-397.

24. Tapia R., Arias C. and Morales E. (1985) Binding of lanthanum ions and ruthenium red to synaptosomes and its effects on neurotransmitter release. J. Neurochem. 45, 1464-1470.

25. Tapia R. and Meza-Ruiz O. (1977) Inhibition by ruthenium red of the calcium-dependent release of [³H]GABA in synaptosomal fractions. Brain Res. 126, 160-166.

26. Tapia R., Meza-Ruiz O., Durán L. and Brucker-Colin R.R. (1976) Convulsions or flaccid paralysis induced by ruthenium red depending on route of administration. Brain Res. 116, 101-107.

27. Tapia R. and Sitges M. (1982) Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. Brain Res. 250, 291-299.

28. Tapia R., Sitges M. and Morales E. (1985) Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. Brain Res. 361, 373-382.

29. York D.H. and Faber J.E. (1977) An electrophysiological study of nigro-ventral relationships: a possible role in turning behavior. Brain Res. 130, 363-366.

Table 1. Effect of haloperidol on the ipsiversive (RuR) or contraversive (muscimol) circling behavior induced by the unilateral microinjection of RuR and muscimol into the nigrostriatal region, as described in Fig. 1. Values are turns/30 min at three time periods. Means \pm S.E.M. for the number of rats shown in parentheses

Period (min)	RuR			Muscimol		
	0-30	31-60	61-90	0-30	31-60	61-90
Control	24 \pm 18	219 \pm 76	406 \pm 110	212 \pm 37	587 \pm 156	493 \pm 153
		(6)			(7)	
Haloperidol	0	0	0	120 \pm 20*	557 \pm 163	424 \pm 150
		(7)			(6)	

Haloperidol (0.1 mg/kg, i.p.) was administered 15 min before the intranigral injection of RuR or muscimol. * $P < 0.05$, as compared to the corresponding control.

Table 2. Effect of haloperidol on the contraversive circling behavior induced by the unilateral microinjection of RuR and muscimol into the nigrostriatal region, as described in Fig. 1. Values are turns/30 min at three time periods. Means \pm S.E.M. for the number of rats shown in parentheses

Period (min)	RuR			Muscimol		
	0-30	31-60	61-90	0-30	31-60	61-90
Control	109 \pm 112	95 \pm 23	95 \pm 44	229 \pm 146	627 \pm 190	436 \pm 170
		(7)			(8)	
Haloperidol	60 \pm 13*	79 \pm 25	124 \pm 36	122 \pm 74*	558 \pm 146	420 \pm 140
		(7)			(5)	

Haloperidol (0.1 mg/kg, i.p.) was administered 15 min before the intraneural injection of RuR or muscimol. * $P < 0.001$, ** $P > 0.05$, as compared to the corresponding control.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Schematic representation of the two nigral regions microinjected with ^{3}H -4 OH and muscimol. Antero-posterior coordinates, with respect to bregma, are indicated. The stippled area is the nigrothalamic region and the dotted area represents the nigrostriatal zone. NR, nigra reticularis; NC, nigra compacta; ML, medial lemniscus; CC, crus cerebri.

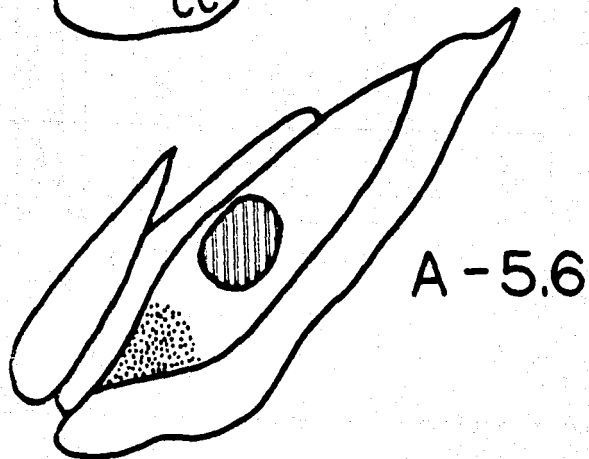
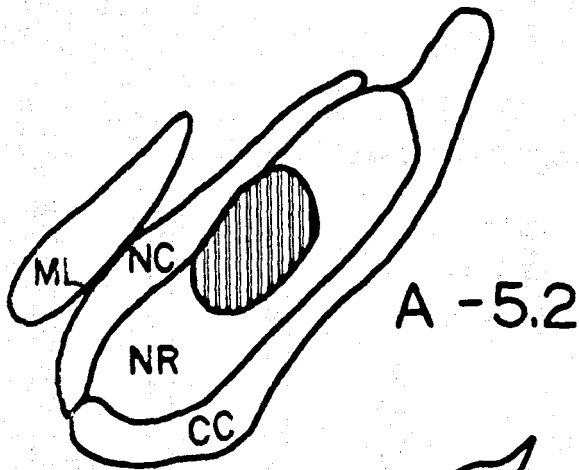


Fig. 2. Circling behavior induced by the unilateral microinjection of RuR, 4-AP and muscimol into the nigrothalamic region of the substantia nigra reticulata, as described in Fig. 1. In all cases the turning was contraversive. The number of complete turns per min is the mean for each 10 min period indicated. Values are means \pm S.E.M. for 10 (RuR), 10 (4-AP) and 4 (muscimol) rats.

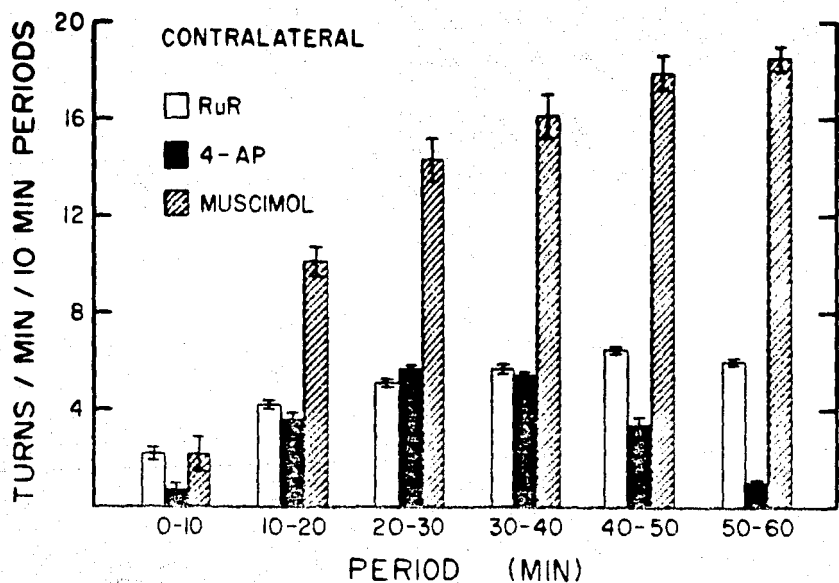


Fig. 3. Long-term observation of the contraversive circling induced by a single unilateral microinjection of RuR into the nigrothalamic region of the substantia nigra reticulata. Turns were recorded during 30 min at different times after treatment. Since not all rats were observed simultaneously, the number of hours corresponding to each value is the mean time of the beginning of the observation \pm 2 h (except for the initial 2 h time, which indicates the observation between 1.75 and 2.25 h). Values are means \pm S.E.M. for 5 rats.

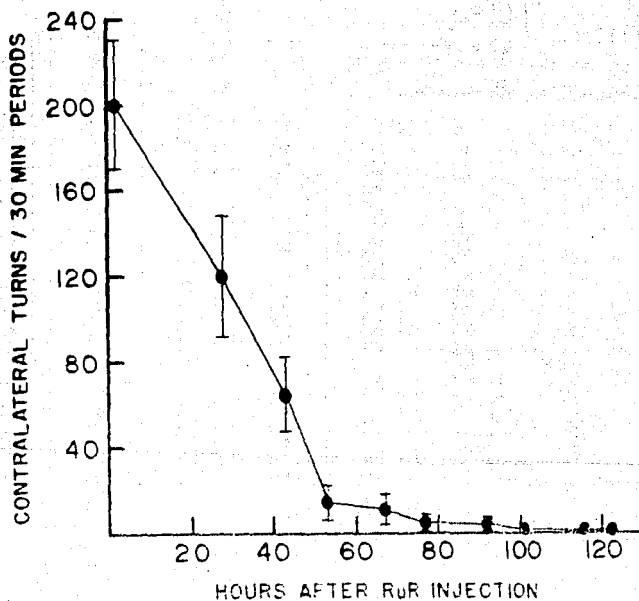
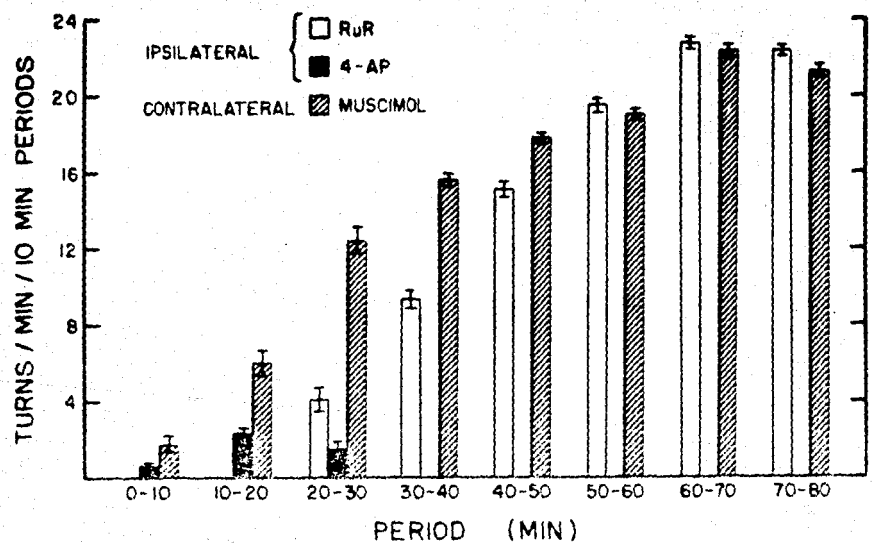


Fig. 4. Circling behavior induced by the unilateral microinjection of RuR, 4-AP and muscimol into the nigrostriatal region of the substantia nigra reticulata. As indicated, the turning induced by RuR and 4-AP was ipsiversive whereas that induced by muscimol was contraversive. Turns/min/10 min periods were calculated as indicated in the legend to Fig. 2. Values are means \pm S.E.M. for 8 (RuR), 6 (4-AP) and 7 (muscimol) rats.



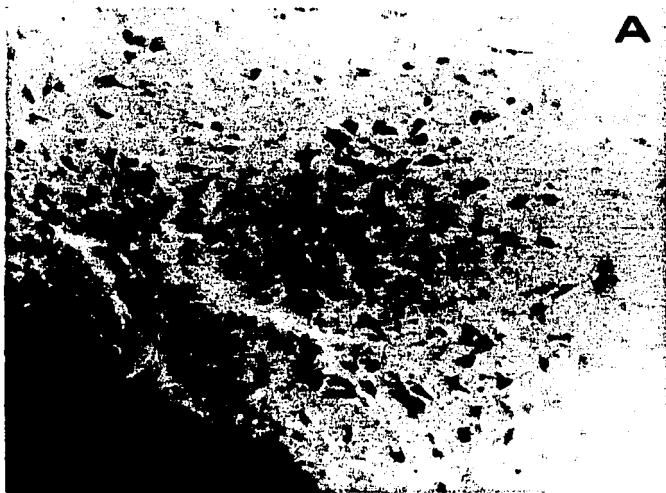


Fig. 5. Example of the appearance of the nigrothalamic region of the substantia nigra reticulata, stained in vivo with microinjected RuR. At 2 h after the microinjection the animals were sacrificed and cryostat sections (40 μm thick) were dehydrated and fixed as described in the text. No further staining in vitro was carried out. A, general view of the injected zone. The dark zone in the lower left corner is the crus cerebri and it is not stained by RuR. B, higher amplification, with interference contrast, of a large stained neuron surrounded by smaller cells. The nucleolus is distinctively stained. The bar represents 200 μm in A and 50 μm in B. This histological appearance was observed in all preparations from 5 different animals.

ESTUDIOS POSTERIORES A LA EDICION DEL MANUSCRITO PRESENTADO EN LA PRIMERA FASE

A.- Estudio del efecto de la denervación GABAérgica mediante la utilización de la neurotoxina ácido quinolinico (AQ).

Con el objeto de conocer el papel de la vía estratonigral en la conducta de giro inducida por RÑu, se administró el agente neurotóxico ácido quinolinico (AQ, 70nmolas/0.5ml) en la porción central del estriado con el propósito de denervar a la SN de esta aferencia. Se escogió esta zona debido a que proyecta a la parte central de la sustancia negra (región nigro-talámica, NT) (Altar y Hauser, 1987; Faull y Mehler, 1978).

El AQ es un derivado del triptófano en la vía metabólica de las kinurenas que ha sido sugerido como el agente etiológico de la enfermedad de Huntington por el grupo de Schwarz; dicho agente a la dosis empleada para este estudio (70 neotas/0.5 ml) produce una lesión sobre las neuronas sin dañar los axones de paso en varias estructuras, entre ellas el hipocampo (Schwarz, 1983).

De este modo, si el RÑu actúa a través de una acción presináptica, entonces la denervación producirá una disminución de la conducta de giro inducida por el RÑu, caso la suposición de que éste actuará inhibiendo la liberación de GABA.

Inicialmente se comprobó bioquímicamente la denervación producida por AQ, mediante de la cuantificación de la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en la parte reticulada de la SN. Dicha actividad se determinó a través de un ensayo isotópico, el microensayo de la GAD, en el que se utiliza

el ácido 1-¹⁴C-Glutámico, el cual al ser descarboxilado por la enzima libera el carboxilo marcado (¹⁴CO₂), que es atrapado por una base fuerte; posteriormente el ¹⁴CO₂ atrapado es disuelto junto con la base fuerte en un coctel de centelleo y contado en un contador de centelleo y referido respecto de la proteína, la cual se determinó por el método de Lowry. Como se puede observar en la tabla 6, la denervación de la vía estrato-nigral producida por el AQ en el estriado de la rata produce una disminución del 44.6 % de la actividad de la GAD con respecto de la SN contralateral al estriado inyectado. Como una segunda forma de comprobar dicha denervación se realizó el análisis histológico del estriado. El AQ produjo una franca pérdida de neuronas grandes y medianas, así como una notable proliferación de células gliales en el estriado (Fig. 4).

TABLA 6. ACTIVIDAD DE GAD DE LA SN IPSILATERAL (SNI) Y CONTRALATERAL (SNC) AL ESTRIADO INYECTADO DE RATAS CON UN PRETRATAMIENTO CON ACIDO QUINOLINICO (7 DIAS ANTES DE LA MEDICION). LA ACTIVIDAD ESTA DADA EN nmolas de CO₂/mg de proteína/hora.

	MEDIA	SEM	n	
SNC	68.4 ±	10.0	6	
SNI	37.2 ±	9.5	6	p < 0.01
	% DEL CONTROL		55.4	

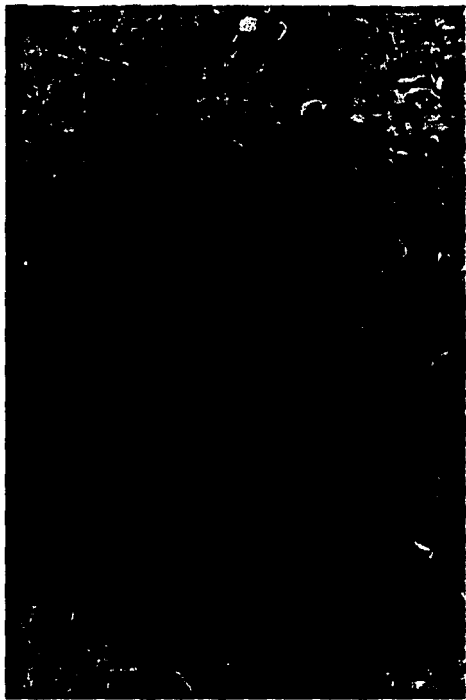


Figura 4. Micrografías del núcleo estriado después de una semana de la administración intrastriatal del ácido quinolínico (6-OH) a. estriado control no inyectado (Ct), b. núcleo estriado inyectado con 70mcg/kg de 6-OH (20x). Notar: 1.- La pérdida de neuronas (flechas); 2.- proliferación de glía en el estriado con 6-OH.

Una vez que se comprobó la denervación tanto bioquímica como histológicamente, se prosiguió con la determinación del efecto de dicha denervación sobre la conducta de giro inducida por la administración del RRU (1.4 nmol/kg/0.2 µl), en la región nigrotalámica (NT).

La administración i.n. de RRU en ratas previamente tratadas con AQ produjo una disminución significativa en la frecuencia del giro sólo en los primeros 30 minutos de observación, como se puede ver en la tabla 7. Sin embargo, el número total de giros producidos en 1 hora por el RRU, tanto en ratas controles (Azul directo 6mg/ml, en el estriado), como en las ratas pretratadas no fue alterado de manera significativa (controles 257.0 ± 46.0; pretratadas 213.9 ± 27.6).

TABLA 7. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON ACIDO QUINDLINICO EN EL ESTRIADO MEDIAL SOBRE LA CONDUCTA DE GIRO PRODUCIDA POR ROJO DE RUTENIO EN LA SN 7 DIAS DESPUES DEL AQ. LOS DATOS SON NUMERO DE GIROS POR PERIODO DE TIEMPO.

TIEMPO (min)	RRU CON AQ n= 7		RRU SIN AQ n= 5		n
	MEDIA	SEM	MEDIA	SEM	
0 - 10	7.0 ± 2.6		18.0 ± 5.2		< 0.001
10 - 20	21.0 ± 3.6		41.6 ± 7.0		< 0.001
20 - 30	36.1 ± 4.9		45.6 ± 7.6		< 0.05
30 - 40	45.1 ± 6.0		44.0 ± 11.1		ns
40 - 50	51.3 ± 8.5		49.4 ± 12.6		ns
50 - 60	53.3 ± 11.5		58.4 ± 14.0		ns

B.- Estudio de la administración de muscimol en el núcleo ventromedial talámico sobre la conducta de giro inducida por la administración i.n. de RRu.

Con base en que se ha demostrado la naturaleza GABAérgica de la vía nigro-talámica, se postuló que probablemente el RRu pudiera estar actuando en los somas neuronales de dicha vía, ya que en las microfotografías de la SN en las que el RRu se localiza en neuronas grandes y medianas (Figura 5 del trabajo enviado a publicación), probablemente de proyección nigrotalámica (Paul y Mehler, 1978); de tal manera que se indujera una desinhibición en el núcleo ventromedial talámico (VMT). De ser cierta esta postulación, si administramos el agonista GABAérgico del tipo "a", el muscimol, en el VMT entonces se prevendrá la conducta de giro inducida por el RRu, ya que esa vía es GABAérgica.

Para probar esta hipótesis se administraron 1.4 nmolas/0.2 ul de RRu en la SN e inmediatamente después se administró el muscimol (0.375 naclas/ 0.2 ul) en VMT (según la misma técnica estereotaxica presentada en el trabajo enviado). Como se puede observar en la figura 5 la administración del agonista GABAérgico, el muscimol, en el VMT produjo una disminución del 75 al 90% (RRu+Mus) al comparar el efecto de la administración de salina en el VMT sobre la conducta de giro inducida por el RRu (RRu+Sal). Además, el efecto protector del muscimol en VMT no es muy específico con respecto al sitio de inyección ya que, como se observa en la barra marcada "RRu+Mus Mal" de la figura 5, en la cual la administración de muscimol 1 mm por encima del VMT produce una disminución significativa después de los 30 min., ésta

disminución es menor a la producida por el muscimol en VMT; este efecto puede ser explicado por que el muscimol pudo difundir, aunque en menor cantidad, al núcleo ventromedial talámico. En algunas ratas (n=3) en las que el muscimol se localizó 1 mm por debajo del VMT no hubo efecto protector al se compara con los controles. En la Figura 6 podemos observar un esquema de los sitios inyectados en este experimento, así podemos observar en "A" la localización de las microinyecciones del RRu en SN, en "B" la localización de las microinyecciones del muscimol en VMT y en "C" la localización de las inyecciones que se situaron 1 mm por encima de VMT.

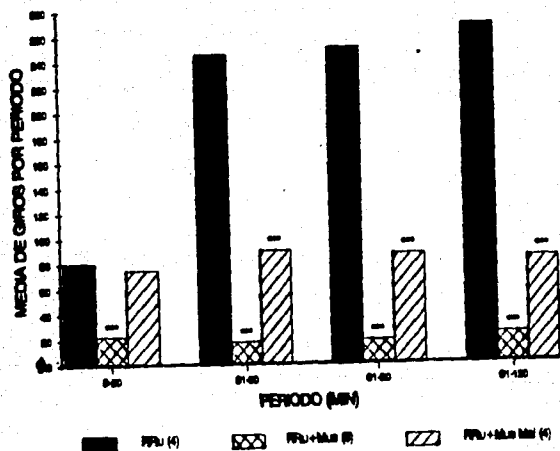


Fig. 5. Efecto de la administración de muscimol (MUS) en el VMT inmediatamente después de la administración del RRu i.v. La columna RRu+Mus M representa los animales en los que la inyección del Mus se localizó aproximadamente 1 mm por encima del VMT. Los valores representan la media de los experimentos; *** corresponde a $p < 0.001$, determinada por la prueba de t-Student al compararse con el control de RRu.

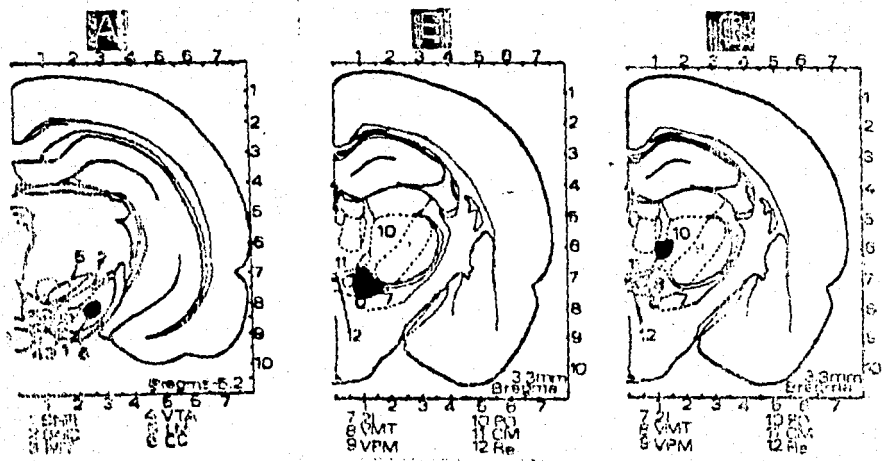


Fig. 4. Esquema de la localización de los sitios microinyectados en este experimento: "A" la localización de las microinyecciones del RRU en SN; "B" la localización de las microinyecciones del muscimol en VMT; "C" la localización de las inyecciones de muscimol que se situaron 1 mm por encima de VMT.

DISCUSION GLOBAL

El RRu, la 4-AP y el muscimol inducen la conducta de giro. El efecto temporal de los tres compuestos varia en gran medida. Así, mientras el RRu induce una conducta de giro que puede ser observada incluso después de 3 días (Fig. 3 del trabajo enviado), el efecto del muscimol es de alrededor de 2 horas y la 4AP es de 40-60 minutos (Fig. 2 y 4 del trabajo enviado, parte C.I de esta tesis). Es necesario resaltar que el efecto de la 4AP no es producido por el bloqueo de los canales de K^+ , ya que la concentración que utilizamos para este estudio está por debajo de la utilizada para dicho bloqueo (Lundh y Thesleff, 1977; Lundh, 1978; Thesleff, 1980; Paganter-Rodales y Orzate, 1981; Kita *et al.*, 1981; Agoston, 1983; Rogawsky y Barker, 1983; Kita *et al.*, 1985).

Es probable que el RRu produzca, a diferencia de la 4AP y el muscimol, una alteración estructural permanente de la SM, ya que las ratas que fueron utilizadas en el estudio de largo plazo, esto es, al día 5 posterior a la administración i.n. del RRu, mostraron gliosis en la zona de difusión del colorante; además de que en estudios de microscopía electrónica realizados posteriormente a la administración del RRu en hipocampo (CA1) se encontró vacuolización, y penetración del RRu hacia el nucleolo neuronal (García-Dgalde y Tapia, comunicación personal). Estos hallazgos son apoyados por los estudios de Singer *et al.* (1972), que encontraron que el RRu puede penetrar al interior de la célula, y por los de Luft, (1971) y Howell (1974) que, aunque se efectuaron *in vitro*, muestran sitios intracelulares de unión del RRu en probables sitios de unión de Ca^{2+} en el citoplasma como

los microtúbulos (Deinum et al. 1961) o alguna otra estructura del citoesqueleto, induciendo finalmente una disminución de la actividad celular. Si este fuera el caso, para el momento en que nosotros incubamos a las rebanadas de CN en 125 I- γ -GABA, para los experimentos de liberación realizados en vivo, las neuronas que captaron el RRu ya no eran funcionales, y sólo aquellas que están fisiológicamente normales captarían el 125 I- γ -GABA de tal manera que cuando se analiza el porcentaje de la liberación total no aparece efecto inhibitor producido por el RRu. Este efecto es apoyado por el hecho que la denervación de la vía estrato-nigral GABAérgica (Tabla 7), sólo inhibe la conducta de giro durante los primeros 30 minutos después de la administración del RRu y posteriormente no hay efecto alguno, probablemente por que a este tiempo el RRu ya ha penetrado a la neurona post-sináptica provocando la disminución en su función o incluso su muerte, lo que se manifiesta a través de la vacuolización encontrada por García-Ugalde y Tapia en los estudios de microscopía electrónica antes mencionados.

Para continuar la discusión de los resultados de manera más clara analizaremos por separado las dos regiones de la SN estudiadas.

Efectos del RRu y 4AP en la región NT de la SN.

En el estudio del efecto producido por la administración de mustimol en el VNT inmediatamente después de la administración de RRu en la SN, encontramos que dicha administración abole la conducta de giro desde un 75% en los primeros 30 minutos de registro hasta un 70% en los siguientes 70 min (Fig. 5). Cabe aclarar que es sólo el componente motor el que es inhibido, ya

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

que el componente postural (postura contralateral) es mantenido. Estos datos confirman la predicción y apoya los resultados de García-Muñoz *et al* (1983) y, de Starr y Summerhayes (1983a y 1983b), quienes concluyeron que el VNT es el sustrato anatómico de la conducta de giro. Sin embargo, existe evidencia de que el componente postural (cuerpo y cabeza) está controlado por otras proyecciones nigrales (la nigro-tectal y la nigro-reticular; Di Chiara *et al*, 1982 y Reavill, 1981, respectivamente).

Por otro lado, el efecto del RRu sobre la liberación de neurotransmisores desde la vía estriato-nigral, fue estudiado a través de la denervación química mediante el uso del ácido quinolinico (AQ). Dicho fármaco fue administrado en la parte medial del núcleo estriado con el fin de destruir las aferencias hacia la parte NT de la SN. El AQ a la dosis estudiada (70nmolas/0.2µl) produce una muerte celular a las neuronas espinosas (GABAérgicas) de proyección estratonigrales mientras que los niveles de dopamina, vasopresina, somatostatina y neuropeptido "Y" no son afectados, como se demuestra en los estudios de Beal *et al*, (1986), revisados por Kowall, *et al*, (1987). En este experimento encontramos que la denervación producida por el AQ sólo tiene efecto sobre la conducta de giro producida por RRu en los primeros 30 minutos, probablemente debido a la inhibición de la liberación de neurotransmisores en algunas aferencias diferentes de la estriato-nigral, ya que a un tiempo posterior ya no hay diferencia entre los datos obtenidos de ratas tratadas con RRu en la SN después del pretratamiento con salina o con AQ intra-estriatal. Este efecto

se explicable si suponiésemos que el RFu ya no actúa a través de la vía aferente GABAérgica estriato-nigral, porque ésta ha sido destruida por el AQ en el estriado, por lo que sólo se mantienen. Únicamente, las interneuronas GABAérgicas y otras vías aferentes, entre estas, la palido-nigral, también GABAérgica que inerva a la región NT de la SN (Smith y Bolam, 1989). Si el RFu actuara en la vía palido-nigral GABAérgica se induciría una conducta de giro con dirección ipsilateral, a no ser que esta vía también siga el patrón de inervación propuesto para la vía estriatonigral; esto es, que esté interactuando primariamente sobre la interneurona inhibidora o sobre las neuronas reticulares de proyección NT y, secundariamente en las dendritas de las neuronas dopaminérgicas.

La administración del RFu produce un movimiento circular con dirección contralateral. Fue inesperado encontrar que el RFu administrado en la NT indujera una conducta de giro en la misma dirección que la producida por el musciol. En efecto, si el sistema GABAérgico estriato-nigral actuara directamente sobre las dendritas de neuronas dopaminérgicas en la zona reticulada, como se propone en el modelo del mecanismo de retroalimentación negativa del circuito estriato-nigral ("striato-nigral feedback mechanism"), en el que el GABA liberado de la vía estriatonigral inhibe directamente a las neuronas dopaminérgicas, dichas neuronas se inhibirían y se manifestaría una conducta de giro con dirección ipsilateral al sitio donde fue administrado el RFu. Se ha establecido firmemente que en lugar de este modelo, la vía estriatonigral forma parte de un sistema de retroalimentación positiva (feed-forward system) a través de las proyecciones de la SN reticulada, considerando que la influencia moduladora del GABA

sobre neuronas dopaminérgicas de la compacta (SNc) podría ser considerado una función adicional de la vía nigro-estriatal (Scheel-Krüger, 1986).

Para esta discusión y con el apoyo del modelo de retroalimentación positiva ("feed-forward mechanism", Gale, 1984; Grace y Bunney, 1979, 1985a y 1985b; Scheel-Krüger, 1986) proponemos un circuito hipotético para la manifestación de la conducta de giro inducida por el ERG, la 4CP y el muscimol, el cual es mostrado en la figura 6a y ampliado en la figura 6b, y que consta de las siguientes poblaciones neuronales y sus sinapsis:

- 1.- interneurona (GABA)
- 1a.- sinapsis entre 1 y 2 (GABA)
- 2.- nigro-compacta estriado (dopamina)
- 3.- nigro-reticulada estriado (dopamina)
- 4.- circuitos estriatales (GABA y/o acetilcolina)
- 5.- neuronas estriado-nigrales (GABA)
- 5a.- sinapsis entre 5 y 1 (GABA)
- 5b.- sinapsis entre 5 y 2 (GABA)
- 6.- neuronas nigro-fugales (VMT -GABA- o colículo superior -GABA- o pedunculo pontino -GABA-)
- 6a.- sinapsis entre 6 (colateral) y 2 (GABA)
- 7.- neuronas VMT-Corteza (Glutámico/aspártico)
- 8.- neuronas piramidales (glutámico/aspártico)
- 9.- neuronas extrapiramidales (cortico-estriatales) (glutámico/aspártico)
- 10.- neuronas de proyección pálido nigrales

modelo

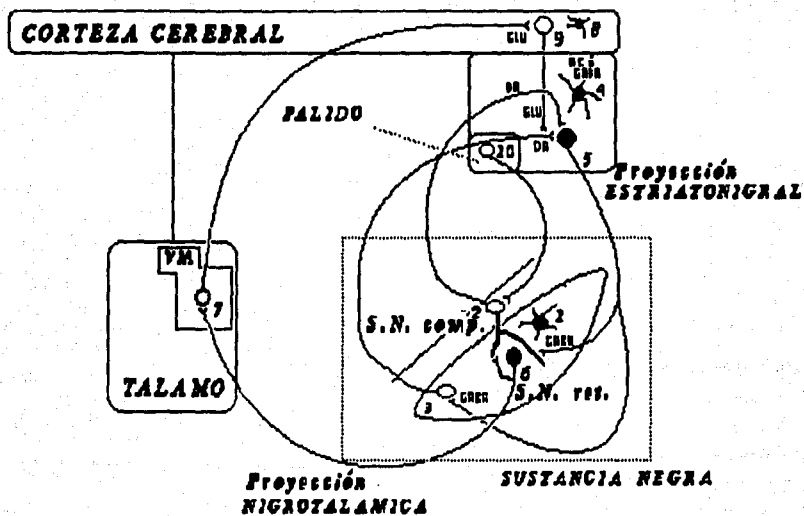


Fig. 3 Modelo hipotético de la organización del sistema que regula la conducta de giron en la rata. (Ver Texto).

Para poder comprender este modelo hay que tomar en cuenta que la conducta de giro inducida por el RRU o el muscimol solamente afecta al sistema dopaminérgico en los primeros 30 minutos, a diferencia de los datos conductuales obtenidos después de la administración en la zona nigro-estriatal reticular (NER), en los cuales el haloperidol abolie completamente la respuesta motora (Tablas 1 y 2 de trabajo enviado) en tiempos posteriores.

En nuestros experimentos el RRU produce un efecto solo en los primeros 30 minutos, al inhibir la liberación del neurotransmisor inhibitor (GABA o Glicina) desde una interneurona (1, Juraska et al., 1970; Grace y Bunney, 1977, 1985a, 1985b; Neurona Golgi tipo II: Francois et al., 1977) o probablemente desde la colateral que emerge de las neuronas de proyección reticulares (6a), Deniau et al., 1982; Grace y Bunney, 1985a, 1985b), las cuales son 20 veces más sensibles al GABA que las neuronas dopaminérgicas (Grace y Bunney, 1977), por lo que un pequeño incremento de las cantidades de GABA liberado pueden ser más fácilmente detectadas por la neurona -1- que por la neurona -2-, debido a la mayor sensibilidad de las primeras. Por el contrario, una disminución en las concentraciones intranigrales de GABA son más fácilmente detectadas por las neuronas dopaminérgicas (por su menor sensibilidad al GABA). Por lo cual la acción inhibitoria del RRU sobre la liberación de GABA en SNr se traduciría primeramente en una desinhibición de la neurona dopaminérgica nigro-estriatal; asimismo, la 4AF al facilitar la liberación de GABA en SNr induciría un incremento de GABA que inhibiría a las interneuronas -1-, las cuales producirían, de esta manera, un incremento en la actividad dopaminérgica nigro-estriatal -2- (Grey, et al., 1977;

Grace y Bunney, 1977; Collingridge y Davies, 1981). Como resultado de esta manipulación se incrementan los niveles de actividad de dopamina en el estriado -4- (Dray, *et al*, 1977; Grace y Bunney, 1979), que, a su vez, inducirán en un incremento de la actividad GABAérgica de la vía estriato-nigral -5- (Gale, 1980; Melis y Gale, 1983), por lo que se produce un incremento de la función GABAérgica en la SN que inhibirá a las neuronas de proyección en la zona reticulada (NT -6-) así como a las interneuronas inhibitorias -1- (Kilpatrick *et al*, 1980).

Posteriormente, después de los 30 min, cuando el RRU ha penetrado a las neuronas en la región reticulada, entre éstas, las de proyección nigrotalámica (6), reduciendo su actividad o incluso causando su muerte, el efecto del haloperidol ya no es observado porque, aunque la vía nigroestriatal este desinhibida y la actividad estriato-nigral aumentada, la salida NT ya no es funcional, y el efecto del haloperidol sobre la conducta de giro ya no es observable. De esta manera, el bloqueo por el haloperidol de los receptores dopaminérgicos disminuye la conducta de giro producida por el RRU, primariamente porque se equilibraría la función dopaminérgica estriatal previniéndose así el incremento de la actividad GABAérgica.

Este modelo proporciona una posible solución a la paradoja de que un incremento en los niveles de GABA en SN actuando sobre la interneurona -1- active al sistema dopaminérgico nigro-estriatal neurona -2-, induciendo por esta razón la conducta de giro en dirección contralateral, ya que si el GABA (muscimol) actuara de manera directa sobre la neurona 2 la conducta resultante, según

el modelo de Ungerstedt (1971), sería un giro con dirección ipsilateral.

Otra probable explicación es que quizá a este tiempo el haloperidol haya perdido actividad o haya sido degradado, lo cual no parece ocurrir, ya que Reavill *et al* (1979) mostraron aún 1 hora después era efectivo, aunque a la dosis que ellos utilizan es 5 veces más alta que la nuestra.

El circuito temporo-espacial definido, en que la conducta de giro contralateral es el resultado de la desinhibición del VMT (Kilpatrick, *et al*, 1981), concuerda con los datos obtenidos al administrar muscimol en el VMT, ya que dicha administración inhibió la conducta de giro producida por el desbalance inducido por el RRu o el muscimol en SN, al actuar inhibiendo la vía NT -6-. Aunque, existe evidencia de que además del VMT existen otras zonas cerebrales que median la conducta de giro, como lo son las proyecciones descendentes de la SN hacia la formación reticular (Reavill *et al*, 1981) o el colículo superior (Di Chiara *et al*, 1982).

Por otro lado, en el estudio de la administración bilateral del RRu en NT, Esas ratas no mostraron ninguna alteración en la simetría de la postura corporal, pero la cabeza era mantenida en hiperextensión y presentaron contracciones clónicas alternadas de los miembros anteriores por un tiempo aproximado de al menos 1 hora. Ocasionalmente presentaron periodos de rigidez generalizada. Estas manifestaciones conductuales pueden explicarse si, tomando de nuevo el modelo, el RRu actúa desinhibiendo bilateralmente al VTN, de tal manera que la actividad motora es activada de una manera equilibrada

produciéndose los períodos de rigidez observados.

Efecto del RRU y la 4AP en la parte NER de la SN.

La administración de RRU en NER produce una conducta motora en la que el cuerpo de la rata se desplaza con dirección ipsilateral mientras que la cabeza se mantiene en dirección contralateral.

En este punto habremos de tomar en cuenta los siguientes 2 hechos:

1.- La estimulación unilateral del sistema dopaminérgico estriatal se traduce de manera general conductualmente como una conducta de giro contralateral a dicha estimulación.

2.- Nuestros resultados indican que el efecto del RRU es sobre el sistema dopaminérgico, como se evidencia por que el haloperidol abolie completamente la conducta de giro (TABLA 1 del trabajo enviado).

De esta manera, si suponemos una acción directa del RRU sobre neuronas reticulares de proyección estriatal (Faulk y Mehler, 1978(-3-) probablemente dopaminérgicas, a través de una entrada del RRU a estas, como se hace evidente en microscopía óptica, se induciría una disolución de la actividad dopaminérgica estriatal (4) llevando a una disminución de la activación dopaminérgica sobre la vía estriato-nigral, por tanto desinhibiendo a la sustancia negra. Esta desinhibición llevaría a un aumento de la actividad nigrotalámica 5AHérgica produciéndose una inhibición de la vía talamo-cortical, lo que se traduce a una actividad dominante del lado contralateral y manifestándose conductualmente como una conducta de giro ipsilateral al sitio de baja actividad

dopaminérgica o contralateral al sitio de la actividad dominante (Ungerstedt, 1971).

Por un lado, este modelo parecería no poder explicar la conducta de giro en dirección contralateral inducida por el muscimol, bajo la suposición de que, si el giro ipsilateral inducido por el RRu es el resultado de una disminución de la actividad dopaminérgica -3-, entonces el muscimol al inhibir a -3- también provocará giro ipsilateral. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos y presentados en la tabla 1 del trabajo enviado, el muscimol parece no estar actuando a través del sistema dopaminérgico, no sabemos actualmente, si esto es debido a que dichas neuronas no presentan receptores GABAérgicos de tipo A. Además, el giro producido por el RRu en SNr no es netamente ipsilateral, ya que, mientras el cuerpo se desplaza ipsilateralmente, la cabeza se mantiene dirigida hacia el lado contralateral. El haloperidol sólo abole el componente activo de la conducta de giro, ya que la rata continúa con una postura contralateral, pero sin desplazamiento. Esto es explicable si tomamos en consideración un probable efecto adicional del RRu sobre algunas de las neuronas que proyectan al colículo superior y formación reticular desde esta zona. Este efecto podría explicar el componente cefálico, ya que después de administrar el haloperidol i.p. se previene el componente motor ipsilateral inducido por el RRu, sin embargo, la rata no se recupera totalmente, ya que mantiene una postura contralateral, la cual es probablemente debida a una acción del RRu sobre dichas proyecciones, siendo estas, la nigro-colicular y la nigro-reticular.

sobre las que actúa el muscimol.

En cuanto a la conducta de giro en dirección ipsilateral producida por la administración i.n. de 4AP en NCR, puede ser explicada si suponemos que ésta puede actuar facilitando la liberación de GABA desde las terminales de neuronas estriatonigrales -5- o sobre las interneuronas de la SNr -1-, induciendo una inhibición mayor sobre las neuronas dopaminérgicas -3-. De este modo y siguiendo con el postulado de Ungerstedt (1971), se induciría una disminución de la actividad dopaminérgica ipsilateral al sitio de inyección llevando a una actividad dopaminérgica predominante en el estriado contralateral y manifestándose conductualmente como giro contralateral al sitio de mayor actividad.

CONCLUSIONES.

Los resultados presentados en esta tesis nos llevaron a concluir los siguientes puntos:

- 1.- El RRU y la 4AP inducen la conducta de giro.
- 2.- El efecto del RRU, a diferencia del producido por el muscimol y la 4AP, es permanente.
- 3.- El RRU no inhibe la liberación de ^3H -GABA de rebanadas de la SN en experimentos realizados ex vivo.
- 4.- El efecto del RRU es bifásico; en la primera fase parece estar actuando a través de la inhibición de la liberación de neurotransmisores, la cual probablemente sea una población de interneuronas inhibitorias; en la segunda fase penetra a las neuronas de proyección GABAérgicas, en el caso de NT, o dopaminérgicas en el caso de NER, disminuyendo su actividad.
- 5.- La desinhibición de las neuronas del VMT producida por la inactivación de la vía NT (inhibidora) produce la conducta de giro con dirección contralateral.
- 6.- La disminución de la actividad de las neuronas dopaminérgicas NER producida por el RRU al penetrar en éstas y por la 4AP al facilitar la inhibición GABAérgica se traduce en conducta de giro con dirección ipsilateral.
- 7.- El efecto del muscimol en NT es a través de la inhibición de una población de interneuronas que inhiben a las neuronas dopaminérgicas por una acción sobre sus dendritas en la reticulada o bien, a través de la inhibición de neuronas de proyección GABAérgica hacia el VMT.

REFERENCIAS

- Agoston, P., Hargittai, P y Nagi, A., 1983. "Effects of 4-aminopyridine in calcium movements and changes of membrane potentials in pinched-off nerve terminals from rat cerebral cortex", *J. Neurochem.*, 41:745-751.
- Altar, C.A. y Hauser, K., 1987. "Topography of substantia nigra innervation by D1 receptor-containing striatal neurons". *Brain Res.*, 410:1-11.
- Dlaustein, H.P., 1988. "Calcium transport and buffering in neurons", *TINS*, 11:436-443.
- Bentivoglio M., Van der Kooy, D. y Kuypers, H.E.J.M., 1979. "The organization of the efferent projection of the substantia nigra in the rat. A retrograde fluorescent double labeling study". *Brain Res.*, 174:1-17.
- Besson, M. J., Kemel, M.L., Gauchy, C.D. y Glowinski, J., 1982. "Bilateral asymmetrical changes in the nigral release of THAPV induced by application of scatcholins in rat caudate nucleus". *Brain Res.*, 241:241-249.
- Bonilla, E.R., 1985. "Basea moleculares de la neurotransmisi6n". *Astro Data S. S.*, Venezuela, pp341-402.
- Bovier, F., Brockkamp, B. y Lloyd, K., 1980. "Enhancing GABAergic transmission reverses the aversive state in rats by electrical stimulation of periaqueductal gray region". *Brain Res.*, 240:315-320.
- Brink, 1954. "The role of calcium ions in neural processes". *Pharmacol. Rev.*, 6:243-297.
- Clarke, F.B.S., Homer, D.W., Fert, A. y Skirboll, L.F., 1987. "Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic efferents from pedunculopontine nucleus in the rat: neuroanatomical and electrophysiological evidence". *Neuroscience*, 23:1011-1019.
- Chevalier, G., Vacher S. y Deniau, J.M., 1984. "Inhibitory nigral influence on tectosomal neurons, a possible implication of basal ganglia in orientative behavior". *Exp. Brain Res.*, 53:320-336.
- Chevalier G., Vacher, S., Deniau, J.M. y Desban M., 1985. "Reinhibition as a basic process in the expression of the functions. I. The striatonigral influence on tectosomal and tectodiencephalic neurons". *Brain Res.*, 334:215-226.

- Consolazione, A., Bentivoglio, M., Goldstein, M. y Toffano, G., 1983. "Evidence for crossed catecholaminergic nigrostriatal projections by combining wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase retrograde transport and tyrosine hydroxylase immunocytochemistry", *Brain Res.*, 338:140-143.
- Deinum J., Wallin, M., Kanje, M. y Lagercrantz, G., 1981, "The effect of reteneum bed on the assembly and disassembly of microtubules and on acid axonal transport". *Biochim. Biophys. Acta*, 673:209-213.
- De Montis, Na. Dianas, Gino Serra, A. Tagliamonte, y Scroel-Krüger, 1979, "Evidence that a nigral GABAergic cholinergic balance controls posture", *Eur. J. Pharmacol.*, 53:181-190.
- Deniau, J. M. y Chevalier, G., 1985, "Decinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. II. The striatonigral influence on thalamocortical cells of the ventromedial thalamic nucleus", *Brain Res.*, 334:227-233.
- Deniau, J.M., Kitai, S.T., Bonaguidi, J.P. y Grofova, I., 1982 "Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axo collaterals of the projection neurons", *Exp. Brain Res.*, 47:105-113.
- Di Chiara, G., Morelli, N., Imperato, A., y Porceddu, M.L., 1982. "A reevaluation of the role of superior colliculus in turning behaviour", *Brain Res.*, 237:61-77.
- Dray A. y Straughan, D.W., 1976. "Synaptic mechanisms in the rat substantia nigra". *J. Pharm. Pharmacol.*, 28:400-403.
- Dray, A., Fowler, L.J., Oakley, M.R., Simmonds, M.A. y Tanner, T., 1977, "Regulation of nigrostriatal dopaminergic neurotransmission in the rat", *Neuropharmacology*, 16:311-318.
- Dray, A. 1979. "The striatum and the SN: a commentary on their relationships", *Neuroscience*, 4:1407-1439.
- Fallon, J.H. y Moore, K.V., 1973, "Catecholamine innervation of the basal forebrain", *J. Comp. Neurol.*, 196:545-580.
- Faull, R. L. y Mehler, W.R., 1978, "The cells of origin of nigrostriatal, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat", *Neuroscience*, 3:989-1002.
- Gale, K., Hong, J.S. y Guidotti, A., 1977, "Presence of substance P and GABA in separate striatonigral neurons", *Brain Res.*, 136:371-375.

- Gale, K., 1980, "Chronic blockade of dopamine receptors by antischizophrenic drugs enhanced GABA binding in substantia nigra", *Nature*, 283:567-1002.
- Gale, K., 1984, "Neurotransmitter interaction in the basal ganglia: "GABA-GABA_A receptor" versus "DA-DA₁ receptor", in *Dynamics of Neurotransmitter Function*, Israel Hanin, ed. Raven Press, New York, 187-209.
- Garcia-Munoz, R., Fallon, J.R., White, A.J. & Arbuthnott, G.W., 1975, "The anatomical substrate of the tinnitus behaviour seen after lesions in the mesencephalic dopamine system", *Neuroscience*, 8:87-95.
- Gauchy, C., H. L. Kesel, R. Ross, A. Chorazy, J. Glowinski & M. J. Besson, 1980, "Effects of nigral application of muscimol on release of 3H-GABA and multiunit activity in various cat thalamic nuclei", *Neuroscience*, 10:731-760.
- Gerfen, C.R., Staines, W.A., Arbuthnott, G.W. & Fibiger, H.C., 1982, "Crossed connections of the rat substantia nigra", *J. Comp. Neurol.*, 207:283-303.
- Grace, A.A. & Bunney, B.S., 1979, "Paradoxical GABA excitation of nigral dopaminergic cells: indirect mediation through reticulata inhibitory neurons", *Eur. J. Pharmacol.*, 59:211-219.
- Greenfield, S.A., Chubb, I.W., Grunewald, E.A., Henderson, Z., May, J., Portroy, S., Weston, J. & Wright, H.C., 1984, "A noncholinergic function for acetylcholinesterase in the substantia nigra: behavioural evidence", *Exp. Brain Res.*, 55:513-520.
- Grofova, J., Deniau, J.M. & Kitai, S.T., 1982, "Morphology of the substantia nigra B-A reticulata projection neurons intracellularly labeled with HRP", *J. Comp. Neurol.*, 209:352-368.
- Herrera-Marschitz, M., T. Bakfólt, U. Ungestrød, L. Tarenius & M. Goldstein, 1984, "Effect of intranigral injections of apomorphine, apomorphine fragments and amphetamine on rotational behaviour in the rat", *Eur. J. Pharmacol.*, 102:213-227.
- Jackson, A. & Crossman, A.R., 1983, "Musculus tensori palmarum: different connections with special reference to the basal ganglia, studied in the rat by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase", *Neuroscience*, 10:725-733.
- James, T. A. & Collinridge, G. L., 1979, "Rapid behavioural and biochemical effects of tetanus toxin microinjected into the substantia nigra: a dual role for GABA", *Neurosci. Lett.*, 11:205-208.

- James, T. A. y Massey, S., 1978, "Evidence for a possible dopaminergic link in the action of amphetamine in the rat substantia nigra", *Neuropharmacology*, 17:687-690.
- James, T. A. y Starr, M.S., 1979, "Effects of substantia P. injected into the substantia nigra", *Br. J. Pharmacol.*, 55:423-437.
- Juraska, J., Wilson, M.C. y Bravo, P.H., 1977, "The substantia nigra of the rat: a review study", *J. Comp. Neurol.*, 172:585-600.
- Karabolos, A. B. y Purpura, D., 1980, "Evidence for autapses in the substantia nigra", *Brain Res.*, 200:467-473.
- Kamino, K., Ogawa, M., Uyesaka, N. y Inouye, A., 1976, "Calcium-binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex", *J. Membrane Biol.*, 26:345-356.
- Kandel, E., 1985, "Nerve cells and behaviour. en: Principles of neural science", Kandel y Schwartz, eds, Elsevier 2a Ed., New York, 1985 pp13-24.
- Kandel, E. y Siegelbaum, S., 1985, "Principles underlying electrical and chemical synaptic transmission", Kandel y Schwartz, eds, Elsevier 2a Ed., New York, pp97-107.
- Katz, B. y Hillel, R., 1967, "The timing of calcium action during neuromuscular transmission", *J. Physiol.*, 189:535-544.
- Kemel, M. L., Gauchy, D.E., Ross, R., Glowinski, J. y Besson, J.M., 1985, "In vivo release of 3H-GABA in rat caudate nucleus and substantia nigra I Bilateral changes by a unilateral nigral application of muscimol", *Brain Res.*, 272:331-340.
- Kilpatrick, I.C., Starr, M.S., Fletcher, A., James, T.A. y MacLeod, N.K., 1980, "Evidence for a GABAergic nigrothalamic pathway in the rat. I. Behavioural and biochemical studies", *Exp. Brain Res.* 40:45-54.
- Kilpatrick, I.C. y Starr, M.S., 1981, "Involvement of dopaminergic in circling responses to muscimol depends on intranigral site of injection", *Eur. J. Pharmacol.*, 69:407-419.
- Kilpatrick, I.C., Starr, M.S., James, T.A. y MacLeod, N.K., 1981, "Evidence for the involvement of nigrothalamic GABA neurons in circling behaviour in the rat", en: GABA and the basal ganglia, Di Chiara, G y Gessa, G.L., eds, Raven Press, New York, 1981, pp205-224.

- Kita, T., Kita, H. y Kitai S.T., 1985, "Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation", Brain Res., 361:10-18.
- Kitai, S. T., Preston, R.J., Bishop, G.A. y Kocsis, J.D., 1979, "Striatal projection neurons: Morphological and electrophysiological studies". en Advances in Neurology, Vol. 24, Frazier, L. S., Searles, T. J. y Bedard, D.S., Raven Press, New York, pp35-51.
- König, J.P.R. y Klippel, R.A., 1963, "The rat brain: A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem". Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kornhuber, H., Kis, J.S., Kornhuber, H., Kornhuber, H.H., 1984, "The cortico-striatal projections reduce glutamate content in the substantia nigra following frontal cortex ablation in the rat". Brain Res., 322:129-135.
- Kowall, N.W., Ferrante, R.J. y Martin J.B., 1987, Patterns of cell loss in Huntington's disease, TINS, 10:24-29.
- Lehman, J. y Langer, S.Z., 1983, "The striatal cholinergic interneurons: synaptic target of dopamine terminals", Neuroscience, 10:1105-1120.
- Luft, J.R., 1971, "Ruthenium red and violet. II Fine structural localization in animal tissues", Anat. Rec., 171:307-416.
- Lundberg J.M. y Hokfelt, T., 1983, "Coexistence of peptides and classical neurotransmitters", TINS, 6:325.
- Lundh, H. y Theiseth, B., 1977, "The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from nerve terminals". Eur. J. Pharmacol., 42:411-412.
- Lundh, H., 1979, "Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission". Brain Res., 163:307-318.
- MacLeod, N.K., James, T.A., Milotnick, I.C. y Starr, M.S., 1980, "Evidence for a GABAergic nigro-thalamic pathway in the rat. II. Electrophysiological studies". Exp. Brain Res., 40:53-61.
- Madeira, V.M.C. y Antunes-Madeira, M.C., 1974, "Interaction of ruthenium red with isolated sarcolemma", J. Membrane Biol., 17:41-50.
- Martin, G. E., Papp, N.I. y Sacino, S.C., 1978, "Contralateral turning evoked by the intranigral microinjection of muscimol and other agonists", Brain Res., 155:277-312.

- Melis, R.D. y Gale, K., 1983, "Effect of dopamine agonists on γ -aminobutyric acid (GABA) turnover in the superior colliculus: Evidence that nigrostriatal GABA projections are under the influence of dopaminergic transmission", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 226:425-431.
- Meza-Ruiz, G. y Tapia, R., 1978, " ^3H -GABA release in synaptosomal fractions after intracranial administration of ruthenium red", *Brain Res.*, 150:163-166.
- Miledi R. y Slater, C.R., 1966, "The action of calcium on neuronal excapses in the squid", *J. Physiol.*, 184:475-490.
- Miller, R.J., 1988, "Calcium signalling in neurons", *TINS*, 11:415-419.
- Moore, C.L., 1971, "Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by ruthenium red", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 42:298-305.
- Mros, E.A., Brownstein, H.J. y Leeman, S. E., 1977, "Evidence for substance P in the striatonigral tract", *Brain Res.*, 125:305-311.
- Nagy, J.L., Carter, D.A. y Fibiger, H.C., 1978, "Anterior striatal projections to the nucleus pallidus, antedorsal nucleus and substantia nigra in the rat: the GABA connection", *Brain Res.*, 150:15-29.
- Nahorski, S.R., 1988, "Inositol polyphosphates and neuronal calcium homeostasis", *TINS*, 11:444-448.
- Nauta, W. J. H. y Domesick, V.B., 1964, "Efferent and afferent relationships of the basal ganglia", en: *Functions of the basal ganglia*, Giba Foundation Symposium 107, Pitman, London, pp3-27.
- Nicoullon, A., Cheramy, A. y Glowinski, J., 1977, "Role of dopamine in substantia nigra in the regulation of nigrostriatal dopaminergic neuron activity", en: *Advances in Neurology*, Vol. 24, Polivic, L. J. Sporkes, T. J. y Bedard, P.J., eds, Raven Press, New York, pp45-51.
- Olpe, H.R., Schellenberg, H. y Koella, P.W., 1977, "Rotational behaviour induced in rats by application of GABA-related drugs and GABA antagonists", *Can. J. Pharmacol.*, 45:291-294.
- Olpe H. R. y Werner, P.K., 1977, "Rotatory behavioural rats by intracranial application of substantia P and an aldoisic fragment", *Brain Res.*, 126:378-379.

- Palkovits, M., Brownstein, M. y Casveda, J.M., 1974, "Serotonin content of the brain stem nuclei in the rat", *Brain Res.*, 80:237-249.
- Pasantes-Morales, H. y Arzate, M.E., 1981, "Effect of laurine on seizures induced by 4-aminopyridine", *J. Neurosci. Res.*, 6:465-474.
- Pasantes-Morales, H., Arzate, M.E., Quezada, O. y Huxtable, R.J., 1987, "Higher susceptibility of laurine-deficient rats to seizures induced by 4-aminopyridine", *Neuropharmacology*, 26:1721-1725.
- Patiño, P. y Garcia-Munoz, M., 1985, "Electrophysiological thalamic responses evoked by dopamine receptor stimulation into the striatum", *Brain Res.*, 341:1-7.
- Perciavalle, V., 1987, "Substantia nigra influences on the nigrostriatal neurons: an electrophysiological and immunohistochemical study in rats and cats", *Neuroscience*, 23:243-251.
- Pérez de la Mora, M., Fuxe, K., Hokfelt, T., y Ljungdahl, A., 1975, "Effect of apomorphine on GABA turnover in dopamine cell group rich area of the mesencephalon. Evidence for the involvement of an inhibitory GABAergic feedback control of the descending dopamine neurons", *Neurosci. Lett.*, 1:109-114.
- Pycock, C., Tarsv, D. y Marsden, C.D., 1976, "The effects of manipulation of cholinergic mechanisms on turning behaviour in mice with unilateral lesion of the nigro-striatal dopaminergic system", *Neuropharmacology*, 17:175-183.
- Pycock, C. J., 1980, "Turning behaviour in animals", *Neuroscience*, 5:461-504.
- Rahamimoff, R. y Ainaes, E., 1973, "Inhibitory action of ruthenium red on neuromuscular transmission", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70:3613-3616.
- Reavill, C., Jenner, P., Leigh N. y Marsden, C.D., 1979, "Turning behaviour induced by injection of muscimol or picrotoxin into the substantia nigra demonstrates dual GABA components", *Neurosci. Lett.*, 13:323-328.
- Reavill, C., Jenner, P., Leigh, N. y Marsden, C. D., 1981, "The role of nigral projections to the thalamus in drug-induced circling behaviour in the rat", *Life Sciences*, 28:1487-1466.

- Rogawsky M. A. y Barker, J.L., 1983, "Effects of 6-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons", *Brain Res.*, 280:189-195.
- Rubin, R. 1982, "Calcium and secretion cellular". Plenum Press, New York, pp45-177.
- Sandberg K., Sandberg, P.R. y Doyle, J.T., 1984, "Effects of intrastriatal injections of the dopaminergic neurotoxin MPTP on spontaneous nocturnal locomotor behaviour in the rat", *Brain Res.*, 299:339-343.
- Scheel-Krüger, J., Magelung, G. y Olanow, H.S., 1981, "The role of GABA in the striatal output systems: Globus pallidus, Nucleus entopeduncularis, Substantia nigra and Nucleus subthalamicus", in: GABA and the Basal Ganglia, Di Chiara, G. y Gessa, G.L., eds., *Adv. Biomed. Psychopharm.* 30:155-186. Raven Press, New York.
- Scheel-Krüger, J., Arnt, J. y Magelung, G., 1977, "Behavioural stimulation induced by muscimol and other GABA agonists injected into the substantia nigra", *Neurosci. Lett.*, 4:351-356.
- Scheel-Krüger, J., 1986, "Dopamine-GABA interactions: evidence that GABA transmits, modulates and regulates dopaminergic functions in the basal ganglia and the limbic system", *Acta Neurol. Scand.*, Suppl. 107. 73:1-47.
- Singer, M., Krishnan, N. y Cyfo, D.A., 1972, "Penetration of ruthenium red into peripheral nerve fibers", *Anat. Rec.*, 173:375-396.
- Somogyi, P., Priestly, J.J., Cuellar, A.C., Smith, A.D. y Bolam, J.P., 1982, "Synaptic connection of substance P-immunoreactive terminals in the substantia nigra of the rat", *Cell Tissue Res.*, 223:469-489.
- Starr, M.S. y Summerhayes, H., 1983a, "Role of the ventromedial nucleus of the thalamus in motor behaviour - 1. Effect of focal injections of drugs", *Neuroscience*, 10:1157-1159.
- Starr, M.S. y Summerhayes, H., 1983b, "Role of the ventromedial nucleus of the thalamus in motor behaviour - 2. Effects of lesions", *Neuroscience*, 10:1171-1183.
- Smith S.J. y Augustine, G.J., 1986, "Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release", *TINS*, 11:453-464.

- Smith, V y J.P. Bolam, 1989. "Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from globus pallidus in the rat". *Brain Res.*, 493:150-162.
- Tapia R., 1985. "Effects of drugs on neurotransmitter release: Experiments *in vivo* and *in vitro*". *Neurosci. Behav. Rev.*, 9:391-385.
- Tapia, R. y Arias, C., 1981. "Calcium transport and the release of neurotransmitters: effects of drugs *in vivo* and *in vitro*". en R. Tapia y C. W. Cotman, eds., *Regulatory mechanisms of synaptic transmission*. Plenum Press, New York. pp146-194.
- Tapia, R., Arias, C. y Morales, E., 1985. "Binding of the lanthanum ions and ruthenium to synaptosomes and its effects on neurotransmitter release". *J. Neurochem.*, 45:1468-1470.
- Tapia, R. y Meza-Ruiz, G., 1977. "Inhibition by ruthenium Red of the calcium dependent release of 3H-GABA in synaptosomal fractions". *Brain Res.*, 125:160-166.
- Tapia, R. y Sitges, M., 1982. "Effects of Laminopyridine on transmitter release in synaptosomes". *Brain Res.*, 250:291-296.
- Tapia, R., Sitges, M. y Morales, E., 1985. "Mechanism of the calcium dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes". *Brain Res.*, 351:370-382.
- Takada, M., Li, Z.K. y Hattori, T., 1980a. "Collateral projection from the substantia nigra to the striatum and superior colliculus in the rat". *Neuroscience*, 75:563-568.
- Takada, M., Li, Z.K. y Hattori, T., 1980b. "Dopaminergic nigrothalamic projection in the rat". *Brain Res.*, 193:165-169.
- Thoenen, G., 1980. "Aminopyridines and synaptic transmission". *Neuroscience*, 5:1413-1419.
- Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Sly, K.P. y Fox, A.P., 1988. "Multiple types of calcium channels and their selective modulation". *TINS*, 11:431-437.
- Ungerstedt, U., 1971. "Post-synaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system". *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 367:69-93.

- Vaccination, F.D., Gazzotti, P., Tiozzo, R. y Carafoli E., 1972. "The effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver". *Biochem. Biophys. Acta.*, 250:43-54.
- Van der Kooy, D. y Hattori, T., 1980. "Unilaterally situated dorsal raphe cell bodies have only unilateral forebrain projections in rat". *Brain Res.*, 192:350-354.
- Van der Kooy, D., Coscina, D.V. y Hattori, T., 1981. "Is there a non-dopaminergic nigrostriatal pathway?". *Neuroscience*, 6:345-357.
- Vincent, S. R., Hattori, T. y McGaer, C.G., 1978. "The nigrostriatal projection: a biochemical and ultrastructural characterization". *Brain Res.*, 151:159-164.
- Warton, S., Jones, D.G., Ilinsky, I. A. y Kuitae-ilinsky, K., 1983. "Nigral and cerebellar synaptic terminals in the intermediate and deep layers of the cat superior colliculus revealed by lesioning studies". *Neuroscience*, 10:799-800.
- Wieraszko, A., 1986. "Evidence that ruthenium red disturbs the synaptic transmission in the rat hippocampal slices through interaction with sialic acid residues". *Brain Res.*, 378:120-126.
- York, D.H. y Faber, J.E., 1977. "An electrophysiological study of nigrostriatal relationships: a possible role in turning behavior". *Brain Res.*, 130:333-336.
- Zainos, A., DeÁnada, R., Chavez, L. y Garcia-Muñoz, M., 1984. "Tucking behaviour, barrel rolling, and sensory neglect induced by picrotoxin in the thalamus". *Exp. Neurol.*, 53:534-547.