

51261
1
24
J.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA



**"MODULACION DE LA SINTESIS Y LIBERACION DE GABA POR
RECEPTORES PRESINAPTICOS D-1 EN LA PARS RETICULATA DE LA
SUSTANCIA NEGRA DE LA RATA. ACCION DE LA L DOPA"**

FALLA DE ORIGEN

Tesis de Investigación presentada por:
Joaquín Benitez Landero
para optar por el grado de
**MAESTRO EN INVESTIGACION EN
BIOLOGIA DE LOS SISTEMAS
HUMANOS**

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I RESUMEN DE TESIS	1
II INTRODUCCION	4
A. JUSTIFICACION.....	4
B. LOS GANGLIOS BASALES Y LA SUSTANCIA NEGRA	5
C. MORFOFISIOLOGIA DE LA SUSTANCIA NEGRA	6
D. RECEPTORES DOPAMINERGICOS	14
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
IV HIPOTESIS DE TRABAJO	20
V OBJETIVOS	21
VI METAS ESPECIFICAS	22
VII METODOS	23
A. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
B. PREPARACION	24
C. LESION CON 6-HIDROXIDOPAMINA	25
D. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	27
E. EVALUACION DE RESULTADOS	35
F. SOLUCIONES Y DROGAS	36
G. ANALISIS ESTADISTICO	39
VIII RESULTADOS	41
A. EVALUACION DEL METODO DEL MODELO DE LESION UNILATERAL DE LA SUSTANCIA NEGRA PARS COM- PACTA CON 6 HIDROXIDOPAMINA	41
B. EXPERIMENTOS DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD	43
C. EXPERIMENTOS DE LIBERACION	48
IX GRAFICAS	53
X DISCUSION	76
A. EVALUACION DEL MODELO DE LESION	76
B. LA ACCION DE LA DOPAMINA EN LA SINTESIS Y LIBERACION DE GABA EN LA SUSTANCIA NEGRA	78
C. LA ACCION DE LA L-DOPA Y LOS RECEPTORES D1	82
XI. CONCLUSIONES	84
XII BIBLIOGRAFIA	85

I. RESUMEN DE TESIS

La sustancia negra es un núcleo mesencefálico, que participa en la coordinación somato-motora. Se relaciona sináptica y funcionalmente con los ganglios basales de los cuales recibe su mayor aferencia sináptica (Dray 1980). Esta formada por dos regiones: la pars compacta y la pars reticulata. La primera esta compuesta de neuronas dopaminérgicas que proyectan al núcleo estriado, y la segunda de neuronas GABAérgicas que proyectan a los núcleos premotores (Carpenter, 1984). Las dendritas de las neuronas dopaminérgicas proyectan a la pars reticulata y ahí liberan dopamina (Geffen et al 1984), formando una proyección que usa dendritas en lugar de axones (Hattori et al 1979).

En la pars reticulata, las dendritas dopaminérgicas hacen sinápsis con las aferentes GABAérgicas estriatales (Wassef y cols. 1981), lo cual sugiere una estrecha interacción presináptica entre los dos neurotransmisores. La naturaleza de esta interacción no ha sido adecuadamente dilucidado, pues se desconoce la acción de la dopamina liberada en las dendritas sobre la liberación de GABA (Chesselett 1984). En esta tesis presentamos datos que sugieren fuertemente que la dopamina modula de manera estimulatoria la liberación de GABA.

Asociados a las terminales GABAérgicas nigrales, se ha demostrado por estudios autoradiográficos (Barone et al. 1987) una alta densidad de receptores dopaminérgicos del tipo D-1 de localización presináptica. Esta particularidad hace que la sustancia negra sea un modelo ideal para el estudio de la fisiología de los receptores D-1 presinápticos y de la liberación de neurotransmisores. Además sugiere que estos receptores controlan la actividad metabólica de la terminal, aspecto hasta ahora no estudiado. En este trabajo exploramos el control de estos receptores sobre una de las actividades metabólicas más importantes de la terminal, la síntesis de neurotransmisores en este caso del ácido gamma amino-n-butirico. Mostramos como la síntesis de GABA está modulada tónicamente por la actividad de estos receptores.

La l-dopa es un agente antiparkinsoniano de uso común que incrementa la concentración de GABA en el líquido-cefaloraquídeo de los pacientes con enfermedad de Parkinson, así también produce un incremento de la actividad de la enzima sintetizante del GABA: la GAD (descarboxilasa del ácido glutámico) (Abbot 1982). Acciones similares a las de la L- dopa, se han mostrado para agonistas de receptores del subtipo D-1 (Trugman y Wooten, 1986). En este trabajo presentamos datos en los que se sugiere la posibilidad de que la l-dopa active los receptores D-1 como agonista farmacológico, reforzando de esta forma la liberación de GABA e incrementando la actividad de la GAD. Con estos

resultados estamos contribuyendo al entendimiento de los mecanismos de acción de esta droga utilizada en la Enfermedad de Parkinson.

II. INTRODUCCION

A. -JUSTIFICACION

El Mal de Parkinson constituye una enfermedad del sistema nervioso central, originada por la degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia negra. Aunque la causa es en esencia desconocida sabemos que la muerte neuronal conlleva a alteraciones motoras caracterizadas por acinesia y temblor. Actualmente las conductas terapéuticas de la enfermedad se basan en el tratamiento quirúrgico o farmacológico. El primero consiste en el trasplante autólogo de células de médula suprarrenal y aún existe controversia en cuanto a su eficacia. El segundo consiste en el uso de fármacos como la l-dopa para suplir la deficiencia de dopamina en las regiones afectadas. No obstante a la fecha no existe un éxito total en el tratamiento de la enfermedad. Es por esto que es importante continuar con el desarrollo de conocimientos sobre la fisiopatología de la enfermedad, el modo de acción de la fármacos y los mecanismos extrapiramidales del control motor.

En este sentido el presente trabajo pretende contribuir al desarrollo del conocimiento de estos aspectos, a aclarar el papel de la dopamina en la sustancia negra y el posible modo de acción de la l-dopa, actual fármaco antiparkinsoniano.

B. LOS GANGLIOS BASALES Y LA SUSTANCIA NEGRA.

Los Ganglios Basales son grandes masas de sustancia gris subcortical, clásicamente considerados como derivados embriológicos del telencéfalo. Dos grandes divisiones de los Ganglios Basales han sido reconocidas y se les ha asociado con funciones distintas. La primera la constituye el Cuerpo Estriado, que comprende al Núcleo Caudado, al Putamen y al Globo Pálido los que se les relaciona con aspectos integrativos de la función somato-motora. La segunda región es el Complejo Nuclear Amigdalino que con respecto a la primera es filogenéticamente más antigua. Este último recibe entradas olfatorias, y proyecta a varias partes del Hipotálamo por lo que se le considera como parte del Sistema Límbico y se le relaciona con funciones viscerales, endócrinas y conductuales (Carpenter 1984). La sustancia negra, por la definición antes dada, no se considera formalmente dentro de los Ganglios Basales, sin embargo debido a la amplia relación sináptica y funcional que guardan entre sí se considera para su estudio dentro de ellos.

C. MORFOFISIOLOGIA DE LA SUSTANCIA NEGRA.

La Sustancia Negra es el núcleo más grande del Mesencéfalo y se localiza bilateralmente en la parte dorsal de los pedúnculos cerebrales. Debe su nombre a la gran cantidad de melanina contenida en sus células y se distinguen en ella tres partes: la pars compacta, la pars reticulata y la pars lateralis.

La pars compacta es una región rica en células que contienen melanina y que se localiza dorsalmente a la pars reticulata que es una región con menor densidad de células las que a su vez contienen sales de hierro (al igual que el Núcleo Rojo) y que forman la mayor parte del núcleo (López-Antunez 1979, Dray 1980). En la pars compacta predominan las neuronas dopaminérgicas, en tanto que en la reticulata, las GABAérgicas. La pars lateralis es una región poco desarrollada formada tanto por células de la pars compacta como de la reticulata.

1. Citoarquitectura.

La sustancia negra presenta tres capas neuronales. a) una capa superior limitada exclusivamente a la pars compacta, en donde las dendritas de las neuronas dopaminérgicas corren lateralmente dirigiéndose al área ventral del tegmento adyacente. b) una capa intermedia donde las dendritas de las neuronas de la pars

compacta corren dorso ventralmente entremezclándose con las dendritas de las neuronas de la pars reticulata y c) una capa profunda o peripeduncular, donde las dendritas de las neuronas de la pars reticulata corren paralelas al pedúnculo cerebral (Jurazka et al., 1977).

También se distinguen tres tipos de neuronas en la Sustancia Negra: neuronas grandes con diámetro entre 45 y 74 μm , neuronas medianas con diámetro de 19 a 25 μm y neuronas pequeñas de menos de 20 μm de diámetro y con árbol dendrítico muy pequeño y axón corto (Jurazka et al., 1977).

La pars compacta está formada en su mayor parte de neuronas de tamaño mediano en un 90 % y pequeñas en un 10 %. Son neuronas ovoideas, poligonales o fusiformes con 3 a 6 dendritas primarias de una de las cuales emerge un axón fino (0.5 μm de diámetro) y que no emite colaterales en su trayecto , estas neuronas forman dos subcapas. La subcapa más dorsal está constituida por neuronas dopaminérgicas fusiformes con árboles dendríticos que se extienden medio lateralmente, continuándose con el área ventral tegmental adyacente y sus axones proyectan al Cuerpo Estriado (Gerfen 1984, 1985, Jimenez Castellanos y Graybiel 1985, Tepper et al 1987). La subcapa más ventral es de mayor densidad y está formada por neuronas piramidales con dendritas varicosas que se proyectan a la pars reticulata (Rinvik y Grofova 1979, Gerfen 1985).

La pars reticulata está constituida por neuronas grandes en un 60 %, e interneuronas en un 40 %. Las neuronas presentan árboles dendríticos con orientación rostro-caudal y perpendiculares a las de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta. Son en su mayoría neuronas de proyección que, a diferencia de las dopaminérgicas emiten colaterales recurrentes que se arborizan y terminan en la pars compacta (Denniau et al 1982).

Las neuronas de la pars reticulata son GABAérgicas y proyectan sus terminales a los núcleos premotores (Tálamo, Colículo Superior y Formación Reticular Mesencefálica) (Carpenter 1984). En la pars reticulata se encuentran los procesos dendríticos de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta. Estas dendritas hacen sinápsis con las terminales GABAérgicas que vienen del estriado (Wassef et al 1981, Van den Pool et al 1985, Nitsch y Riesemberg 1988), y como sus axones estriatales liberan dopamina (Hattori et al 1985). Dado que no se han encontrado vesículas sinápticas en los procesos dendríticos, se piensa que la dopamina liberada de las dendritas proviene del sistema retículo endoplasmático (Dray 1980).

Las sinápsis en la pars reticulata son de tipo axo-dendrítico observándose frecuentemente botones " en passant " de una terminal haciendo sinápsis con un proceso dendrítico (Bak et al 1975). En la pars compacta los contactos sinápticos de tipo axo-somático son mas frecuentes y se forman entre terminales que

se originan en su mayoría en el Globo Pálido ipsilateral con las neuronas dopaminérgicas (Hattori et al 1973, 1975).

2. Relaciones sinápticas.

Aferentes. Como hemos mencionado la Sustancia Negra se estudia con los Ganglios Basales debido a las relaciones sinápticas estrechas que guardan entre sí (Nauta y Domesik 1984). La mayor aferencia de este núcleo proviene del Cuerpo Estriado. El Cauda-putamen envía axones a la pars reticulata, en tanto que el Globo pálido envía axones a la pars compacta (Hattori 1973, Araki et al 1985). Ambas proyecciones constituyen el 95 % de las aferente nigrales y se sabe que el GABA es su neurotransmisor (Carpenter 1984).

Otras proyecciones menos importantes han sido descritas hacia la sustancia negra, tal es el caso de la proyección subtálamo-nigral (Nakanishi et al 1987), la proyección rafe nigral (Pasik et al 1984) y la proyección Pedúnculo-pontino nigral (Benninato y Spencer 1988).

Eferentes. Las proyecciones eferentes se dividen en las dopaminérgicas y las no dopaminérgicas. Las dopaminérgicas

parten de la pars compacta y proyectan al Cuerpo Estriado. Las no dopaminérgicas parten de la pars reticulata y proyectan a los núcleos premotores del Tálamo, al Colículo Superior y la Formación Reticular Mesencefálica y usan GABA como neurotransmisor.

3. Fisiología general.

La Sustancia Negra está involucrada junto con los Ganglios Basales en el control del movimiento voluntario y forman parte del sistema extrapiramidal (Dray 1980). El Cuerpo Estriado recibe la información de los movimientos voluntarios originados en la corteza y al fluir a través de los ganglios basales es facilitada y focalizada, lo que permite la activación de un grupo muscular. Esta acción se lleva a cabo por los circuitos de retroalimentación en los que participa la pars reticulata de la Sustancia Negra la cuál respresenta una estación de salida de la información descendente (Penny y Young 1983). Por otro lado el papel de la pars compacta, única fuente de dopamina de los Ganglios Basales , se encuentra aún sin dilucidar, sin embargo la enfermedad de Parkinson que presenta una amplia gama de alteraciones motoras destaca la importancia de este núcleo en el control motor, ya que la enfermedad está dada por la degeneración selectiva de las neuronas de esta parte de la Sustancia Negra. (Zigmond y Stricker 1983).

4. La dopamina en la Sustancia Negra.

La dopamina parece tener un papel importante como neurotransmisor en la Sustancia Negra. Una apreciable cantidad de dopamina está contenida en las dendritas de las neuronas dopaminérgicas que proyectan a la pars reticulata (Dray 1980).

Las dendritas son de tipo varicoso y contienen cúmulos de vesículas pleomorficas que forman densos racimos capaces de capturar dopamina (Bjorkund y Lindvall 1975). La estimulación eléctrica y con alta concentración de Potasio (Geffen et al 1976, Aceves y Cuello 1981) de la Sustancia Negra originan una liberación de dopamina dependiente de Calcio externo. Aparentemente la dopamina dendrítica proviene de retículo endoplásmico, ya que no se observan vesículas sinápticas como tal en las dendritas (Hattori et al 1979, Wassef 1981). Se puede decir que las dendritas forman una verdadera proyección nigro-nigral que usa las dendritas, en lugar de axones para transmitir o recibir información.

El papel fisiológico de la dopamina liberada de las dendritas en la Sustancia Negra, se encuentra en discusión. Tres líneas de investigación han postulado las siguientes hipótesis.

a. La primera sugiere que la dopamina activa a un autorreceptor somato-dendrítico que controla el disparo neuronal. La base experimental de la hipótesis se encuentra en estudios con animales íntegros, en los que la dopamina y los agentes dopaminérgicos del subtipo D-2 inhiben el disparo de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta (Carlsson et al 1987), lo mismo que estudios "in vitro" que muestran que la activación de los receptores D-2 de la Sustancia Negra producen una hiperpolarización de las neuronas dopaminérgicas al activar una corriente de Potasio (Lacey et al 1988). Apoyando esta hipótesis los estudios de receptor-ligando específico han mostrado la presencia de los receptores D-2 asociados al soma y dendritas de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta (Bekstead 1988).

b. La segunda línea de investigación sugiere que la dopamina liberada de las dendritas modula la acción inhibitoria del GABA y de la vía estriado-nigral sobre las neuronas GABAérgicas de proyección de la pars reticulata. Es decir se sugiere que atenúa los efectos inhibitorios del GABA. La base experimental de la hipótesis se encuentra en estudios electrofisiológicos, en los que la aplicación local de dopamina en la pars reticulata, que por si sola no modifica la actividad de las neuronas GABAérgicas, atenúa la inhibición que la aplicación local de GABA produce en estas neuronas, de igual forma atenúa la inhibición producida por estimulación de la vía estriado-nigral. No obstante

ni el receptor involucrado, ni el mecanismo de modulación están dilucidados. Por otro lado los estudios de receptor ligando no han mostrado receptores dopaminérgicos en estas neuronas. Se requiere de investigación más detallada para interpretar los hallazgos (Waszscak y Walters 1984).

c. La tercera hipótesis es tema de esta tesis, en ella proponemos que la dopamina liberada de las dendritas, activa receptores presinápticos del subtipo D-1 que modulan la liberación y síntesis de GABA en las terminales estriado-nigrales.

D. Receptores Dopaminérgicos

Actualmente se reconoce la existencia de dos subtipos de receptores a dopamina. La base de su clasificación esta en sus propiedades farmacológicas y la consecuencia bioquímica de su activación (Stoof y Keabian, 1984). Tales subtipos son los receptores D-1 y D-2.

1. Receptores D-1.

Los receptores D-1 al ser activados estimulan la actividad de la adenilato ciclasa y en consecuencia incrementan la producción de AMPc. Dicha estimulación ocurre por medio de los nucleótidos de guanina. La proteína G que sintetiza los nucleótidos de guanina posee 2 subunidades, la estimuladora (Ns) y la inhibitoria (Ni) (Kelly et al, 1987; Olianas y Onali, 1987). Los receptores D-1 activan la subunidad Ns, que activa a la adenilato ciclasa, con la consecuente síntesis de AMPc (Olianas y Onali, 1987).

El AMPc intracelular está relacionado con la fosforilación de proteínas, que se encuentran asociadas a canales iónicos o procesos enzimáticos, como los que median la síntesis de neurotransmisores (Mestikaw y cols, 1986).

Se dispone actualmente de agonistas farmacológicos específicos que actúan sobre los receptores D-1 como el SKF 38393 y de

antagonistas selectivos de los mismos como el SCH 23390 (Stoof y Keabian, 1984).

2. Receptores D-2.

La activación de receptores D-2 conlleva a una reducción importante de la actividad de adenilato ciclasa y a la disminución de la formación de AMPc en la mayor parte de las preparaciones (Kelly et al, 1987; Tanaka et al, 1986). Este proceso, también involucra la participación de la proteína G reguladora pero a través de la subunidad inhibitoria Ni (Cooper et al, 1986). La activación de esta subunidad depende de Sodio la cuál inhibe la adenilato ciclasa y la formación de AMPc.

No todos los eventos de la activación de los receptores D-2, llevan a la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa (Stoof et al 1982). En algunos casos en los que esta asociación no se presenta, se ha encontrado una inhibición de la formación de fosfoinositidos por un probable acople de estos receptores con la fosfolipasa C (Pizzi et al, 1987). Dicha inhibición es probablemente la responsable de la inhibición de los flujos de Calcio, en preparaciones en las que los receptores D-2 se asocian a inhibición de la liberación de neurotransmisores (Fujiwara et al, 1987; Pizzi et al, 1987, 1988). Actualmente también se dispone de agonistas y antagonistas farmacológicos específicos sobre estos receptores, tal es el caso de la

bromocriptina como agonista y el l-sulfíride como antagonista, solo por mencionar algunos de ellos (Stoof y Keabian 1984).

3. Eventos fisiológicos asociados a los receptores dopaminérgicos del Sistema Nervioso Central.

Poco se sabe acerca de los eventos fisiológicos en los que los receptores D-1 están involucrados (Stoof y Keabian 1984). Los receptores D-2 presinápticos inhiben la liberación de neurotransmisores tal es el caso del: ácido glutámico (Brown y Arbuthnott, 1983) la acetil-colina (Stoof y cols , 1982) la dopamina (Herman y Langer 1982) y algunos péptidos (Stoof y Keabian 1984). Los receptores D-2 post-sinápticos producen inhibición del disparo neuronal al activar una corriente de Potasio la cual produce una hiperpolarización membranaral (Lacey et al 1987).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los receptores D-1 han sido descritos como elementos presinápticos de las terminales estriado-nigrales y otras terminales GABAérgicas de los ganglios basales (Barone et al, 1987). Sin embargo, la consecuencia funcional de su activación se desconoce (Walaas y cols. 1988). Causa de lo anterior puede radicar en la falta de estudios adecuadamente diseñados para tal efecto. La fuente de dopamina para activar los receptores D-1 de los ganglios basales, la constituye la neurona dopaminérgica de la pars compacta de la sustancia negra, cuyos axones proyectan al cuerpo estriado y sus dendritas proyectan a la pars reticulata (Gerfen 1987). Las dendritas liberan dopamina como sus terminales axónicas (Hattori et al 1979). La localización presináptica del receptor D-1 sugiere modulación de la síntesis y liberación del neurotransmisor de estas terminales estriado-nigrales, en este caso GABA. Las técnicas habituales de estudio de la liberación de GABA, no han arrojado luz con respecto a este punto, debido a que también se produce la liberación de dopamina de las dendritas y en consecuencia se enmascara el efecto de los agentes dopaminérgicos que se agregan para modificar la liberación (Chesselet 1984).

En este trabajo, nos proponemos estudiar la modulación de la liberación de GABA por dopamina. Nuestro modelo experimental, lo

constituye la rebanada de sustancia negra reticulata desnervada de su aferencia dopaminérgica, la cuál no presenta el inconveniente de que cuando se evoque la liberación de GABA se libere también dopamina proveniente de las dendritas. La desnervación se producirá por lesión química de la pars compacta de ratas intactas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Zigmond y Stricker 1984).

La L-dopa y los receptores D-1.

La L-dopa formada durante la biosíntesis de la dopamina, se ha usado como efectivo agente antiparkinsoniano. La enfermedad de Parkinson se produce por la degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia negra, cuya etiología es aún desconocida (Barker 1988). Acompañando a esto existe una disminución de la actividad de la enzima sintetizante del GABA (GAD) en los ganglios basales (Abott et al 1982). El mecanismo por el cual la L-dopa produce mejoría clínica de estos pacientes no ha sido adecuadamente dilucidada (Karoum et al 1988).

En algunas preparaciones, se ha mostrado que la L-dopa mimetiza efectos producidos por agentes dopaminérgicos del subtipo D-1. Tal es el caso de estudios de captura neuronal de 2 de-oxi-glucosa radioactiva (Trugman y Wooten 1986). Lo mismo se ha encontrado, que la L-dopa incrementa el nivel de GABA en el

líquido cefalo raquídeo de los pacientes con enfermedad de Parkinson, así como la actividad la GAD (descarboxilasa del ácido glutámico), los cuales están significativamente disminuidos en estos pacientes (Abbott 1982). Como el GABA se sintetiza y libera en las terminales GABAérgicas del Sistema Nervioso Central, es posible que la L-dopa actúe directamente como agente dopaminérgico del subtipo D-1 y produzca así sus efectos terapéuticos. Esto implica que la activación de estos receptores conllevará también a un aumento de la síntesis y liberación de GABA. Estos aspectos los exploramos en este trabajo. Nuestro modelo para estudiar la síntesis de GABA lo constituye una vez más la rebanada de sustancia negra reticulata de rata desnervada de su aferencia dopaminérgica.

La rata con lesión de la pars compacta de la sustancia negra constituye el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, (Zigmond y Stricker 1984) es por esto que los resultados de este trabajo pueden ser importantes para entender la fisiopatología de la enfermedad, así como la acción terapéutica de la L-dopa y contribuir a aclarar el papel de la dopamina y los receptores D-1 en el Sistema Nervioso Central.

IV. HIPOTESIS DE TRABAJO

Con base en los antecedentes mencionados proponemos las siguientes hipótesis de trabajo.

1.- El papel funcional de los receptores D-1 presinápticos es facilitar la liberación de GABA, así como incrementar la actividad de la enzima sintetizante del neurotransmisor en las terminales estriado nigrales.

2.- La L-dopa es un agente farmacológico capaz de activar los receptores D-1 presinápticos produciendo también un incremento en la síntesis y liberación del GABA.

V. OBJETIVOS

- 1.- Aclarar el papel funcional de los receptores D-1 presinápticos dopaminérgicos en la sustancia negra de la rata.
- 2.- Dilucidar el mecanismo de acción farmacológica de la l- dopa al activar receptores dopaminérgicos del subtipo D-1

VI. METAS ESPECIFICAS

- 1.- Dilucidar si los agentes dopaminérgicos del tipo D-1 son capaces de estimular la liberación y síntesis de GABA en la pars reticulata de la sustancia negra de la rata.
- 2.- Dilucidar si la L-dopa mimetiza los efectos de los agentes D-1
- 3.- Dilucidar si la dopamina liberada de las dendritas, produce efectos similares a los de la l-dopa y agentes D-1

VII. METODOS

A. DISEÑO EXPERIMENTAL.

1. Estudiamos la actividad de la GAD (descarboxilasa del ácido glutámico), enzima sintetizante del GABA en el modelo " in vitro " de rebanadas de pars reticulata de la sustancia negra, tanto en ratas normales como en ratas lesionadas del sistema dopaminérgico nigral. La evaluación de la actividad de la enzima, se hizo indirectamente por medio de la acumulación de GABA, provocada por la presencia del inhibidor de la enzima que degrada al neurotransmisor: el ácido aminooxácético (Bernasconi y cols 1982). Posteriormente, sobre la cinética de acumulación se estudio el efecto de la denervación; de los agentes dopaminérgicos que activan receptores D-1, como el SKF 38393; de la dopamina misma y el bloqueo de ellos por el SCH 23390 (antagonista específico de estos receptores). También estudiamos el efecto de la l-dopa sobre dicha síntesis.

2. Se estudio la liberación de GABA radioactivo, previamente capturado por rebanadas de pars reticulata de la sustancia negra de ratas denervadas. La liberación se indujo por una alta concentración de K, de acuerdo al metodo descrito por Florán y cols (1988), y se probó el efecto de la dopamina y la l-dopa. También se estudio el bloqueo del SCH 23390 sobre estas drogas.

Las acciones de la dopamina endógena, se evaluaron por el efecto de la metanfetamina sobre la liberación de GABA en rebanadas de ratas no lesionadas.

B. PREPARACION

Los experimentos de liberación de GABA radioactivo y de actividad de la GAD se efectuaron en rebanadas (300 μM espesor) de la pars reticulata de la sustancia negra provenientes de ratas machos Wistar normales y lesionadas unilateralmente de la pars compacta con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el cerebro completo de la cavidad craneal y se sumergió en solución Krebs-Hanseleit a 4 grados C. Del cerebro se cortó un bloque de tejido que incluía el núcleo a diseccionar y se fijó en un soporte metálico que se montó en un vibratomo (Oxford modelo G), donde se obtuvieron rebanadas de cerebro de 300 μM de espesor que se mantuvieron en solución de Krebs a 4 grados centigrados, burbujeada con una mezcla de CO_2 y O_2 .

Las rebanadas se colocaron en un portaobjetos frío y la sustancia negra reticulata se diseccionó bajo microscopio estereoscópico con un bisturí. De acuerdo al atlas estereotáxico de Koning y Klippel (1970), la sustancia negra queda incluida siguiendo el eje anteroposterior entre 2580 y 1600 micras. Una vez obtenidas se continuó con el protocolo experimental de liberación de GABA radioactivo o de GAD, según el experimento.

C. LESION CON 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA).

En algunos experimentos, según se indique se produjo denervación del sistema dopaminérgico nigro-estriatal, con objeto de obtener rebanadas de sustancia negra reticulata en las cuales se produjera degeneración de las dendritas provenientes de las neuronas dopaminérgicas (Hattori 1979). Para ello, las neuronas fueron lesionadas químicamente, mediante la aplicación esteretotáxica de 6-hidroxidopamina en la pars compacta de la sustancia negra de un solo lado.

Las ratas (200-230 grs.) fueron anestesiadas con hidrato de cloral (400 mgs por Kg de peso) y mediante un corte sagital de la piel del cráneo y exposición ulterior del hueso, se realizó un orificio de 1.5 mm de diámetro con un taladro odontológico en las coordenadas 2.2 mm lateral y 5.4 mm posterior (tomado a Bregma como 0). En este sitio se insertó una jeringa Hamilton (5ul) hasta una profundidad de 7.2 mm a partir de la duramadre. Estas coordenadas fueron determinadas previamente por inyección de azul de metileno y corroboración histológica. Se inyectó una solución de 6-OHDA (6ug/ul en solución salina isotónica y ácido ascórbico 0.02% para prevenir la oxidación de la toxina), a una velocidad de 1 ul/minuto. El volumen inyectado fué de 2 ul. Después de extraer la jeringa, se suturó por planos.

El grado de degeneración de las neuronas dopaminérgicas fué evaluada de dos maneras distintas :

1. Conductualmente. Una semana después de la aplicación de la toxina, los animales recibieron una inyección subcutánea de d-l-metanfetamina (10 mgrs/Kg) y se evaluó la conducta de giro ipsilateral producida por la droga de acuerdo al método descrito por Ungersted en 1971. Se correlacionó la velocidad de giro con el grado de lesión (ver más adelante como calcularse), para que através del parámetro conductual se pudiera seleccionar las ratas que fueron usadas.

2. Bioquímicamente. Se determinaron los niveles de dopamina en el estriado (principal núcleo de proyección de las neuronas de la pars compacta) y sustancia negra en el lado lesionado y en el normal. Para esto, además de disecar la sustancia negra, se disecó el núcleo estriado el cuál fué homogenizado en 500 ul de ácido perclórico 0.1 N y se centrifugó a 1200 RPM por 90 segundos. Del sobrenadante se tomaran 15 ul para determinar el contenido de dopamina por HPLC con detección electroquímica. La columna usada fué C18 (Perkin Elmer), la velocidad de flujo de 1.4 ml/min. El potencial de oxidación se mantuvo a 0.8 volts con respecto al electrodo de referencia Ag/Ag Cl. Con esta medida se corroboró que el nivel de dopamina en el lado lesionado esta por debajo del normal al menos en un 90 %. Este se evaluó calculando el porcentaje de lesión mediante la siguiente fórmula :

% lesión =

$$I \quad 1 - \left(\frac{\text{Contenido de dopamina lado lesionado}}{\text{Contenido de dopamina lado normal}} \right) \times 100$$

ver figura 1.

D. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

1. Experimentos de actividad de la GAD.

Las rebanadas de pars reticulata fueron disecadas bajo microscopio y colocadas en un sistema de cámaras de incubación fabricadas con jeringas para insulina (ver figura 2). Se colocaron tres rebanadas por cámara, la cuál contenía 400 μ l. de una solución de Krebs-Henseleit, burbujeada continuamente con una mezcla de CO₂ y O₂ a través de una aguja dental. En estas condiciones permanecieron durante 30 minutos (periodo de equilibrio). Posterior a este tiempo, se agregó ácido aminoxiacético (AAOA) al medio de incubación hasta alcanzar una concentración final de 10⁻³M, en la cuál diferentes muestras permanecieron por diferentes periodos de: 5, 10, 20, 40 y 60 minutos. Al cabo del este tiempo, las rebanadas fueron trasladadas a una solución de ácido pérclorico 0.1N en un

LESION CON 6-OHDA

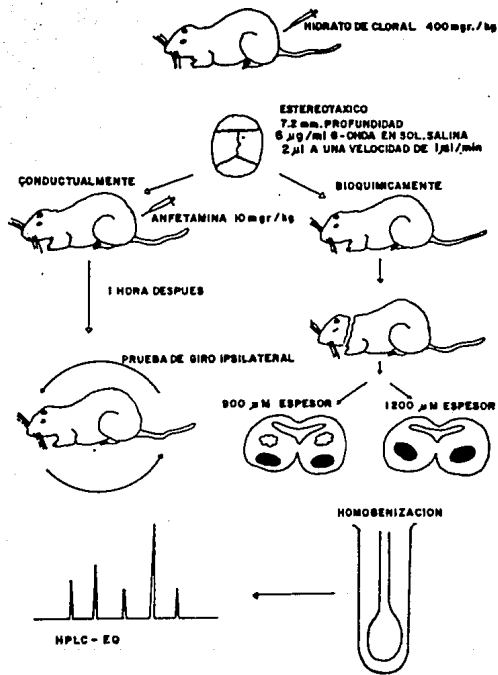
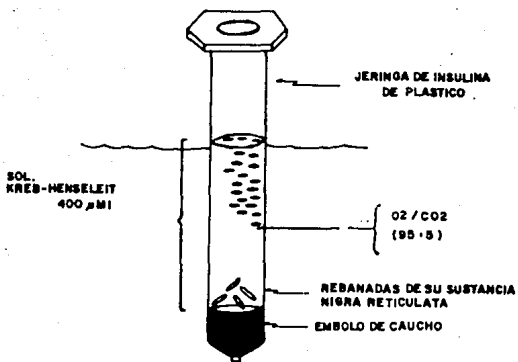


FIGURA 1

CAMARAS DE INCUBACION



- 1° PERIODO DE EQUILIBRIO 30 MIN.
- 2° AADA 10 μ M DURANTE 10, 20, 40, 60 MIN.
- 3° DROGAS UTILIZADAS SEGUN EL EXPERIMENTO

FIGURA 2

volumen de 400 ul. para detener la reacción de acumulación de GABA que produce el ácido aminooxiacético.

En este volumen las rebanadas fueron homogenizadas manualmente. Del homogenizado total, 25 ul fueron utilizados para determinación de proteína por el metodo de Lowry. Del resto de la muestra se obtuvo el sobrenadante previa centrifugación en una microcentrifuga airfuge (Beckman) a 33 PSI por 1 minuto. El sobrenadante se filtro en membranas de naylon de 0.2 micras del cuál 50 ul fueron procesados para cromatografía líquida de alta presión con detección flourométrica. El análisis de HPLC se llevó a cabo usando una columna RP 18 (Merk). La fase móvil se usó a un flujo de 1 ml/min, y el reactivo de flourescencia a un flujo de 0.5 ml/min. La longitud de onda de exictación/emisión del espectroflourómetro fué 330-380/460-600 nm. La derivación usada fué post-columna (ver figura 3 y 4). Los resultados de la cantidad de GABA fueron expresados como microgramos / mgr de proteína

2. Experimentos de liberación de GABA radioactivo.

Las muestras destinadas a los experimentos de liberación, se colocaron en 2 ml de solución Krebs a 37 grados centígrados por 30 minutos (periodo de estabilización), esta solución posteriormente fue reemplazada por una solución fresca que contenia 2×10^{-8} M de 3-H GABA (65 Ci/ mmol), en presencia

EXPERIMENTOS DE ACTIVIDAD DE LA GAD

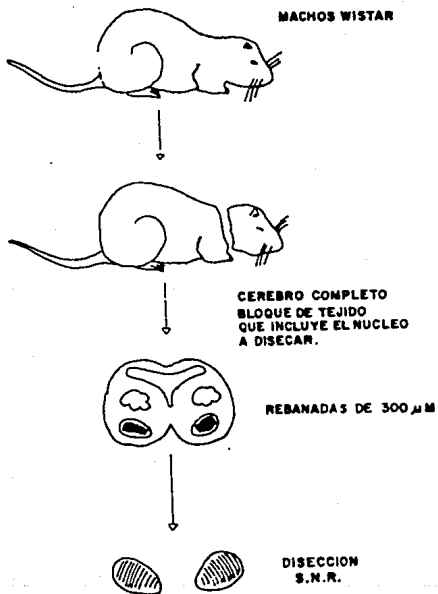


FIGURA 3

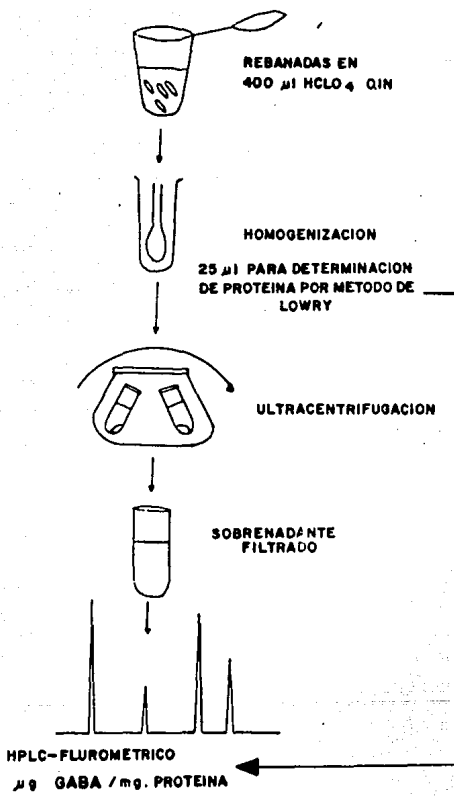


FIGURA 4

de b-alanina (1 μ M) para bloquear la captura glial. Esta segunda incubación duró 30 minutos (periodo de marcaje). Luego las rebanadas se lavaron manualmente con solución de Krebs 3 veces para eliminar el exceso de radioactividad no capturada y posteriormente se transferieron a camaras de perfusión (Aceves y Cuello 1981) para continuar el experimento (Ver figura 5).

Las rebanadas se colocaron al azar en las cámaras de perfusión después del periodo de marcaje. Se introdujeron 4 rebanadas por cámara. La velocidad de perfusión del tejido fue de 0.5 ml por minuto y se mantuvo durante 1 hora (segundo periodo de equilibrio) antes de iniciar el experimento la perfusión se hizo con solución de Krebs normal (6.25 mM de K) la cual contenía ácido nípecótico 10-5 μ M. para bloquear la recaptura de GABA por las terminales (Krogsgaard-Larsen y Jhonston 1975).

Una vez terminado el 2o. periodo de equilibrio, las muestras fueron expuestas a una alta contracción de K para inducir la liberación de GABA radioactivo de las terminales. La estimulación duró 80 minutos, tiempo durante el cual se tomaron 20 fracciones de 2 ml cada una del líquido de perfusión, en el que se colecta el neurotransmisor liberado. Al final de la estimulación, las rebanadas fueron extraídas de las camaras y se transferieron a recipientes "viales" en donde se les solubilizó con tritón X-100 al 5%. A las muestras colectadas durante la estimulación y los tejidos solubilizados se les agregó 12 ml de

SISTEMA DE PERFUSION

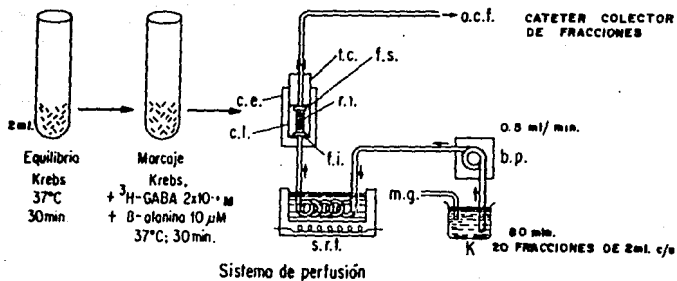


FIGURA 5

líquido de centelleo a base de tolueno, para determinar su radioactividad, la cuál fué cuantificada en un contador de centelleo usando métodos convencionales.

E. EVALUACION DE RESULTADOS.

1. Experimentos de la Actividad de la GAD.

Los contenidos de GABA de las rebanadas se expresaron como el total de GABA de la muestra en ngrs, dividido entre el contenido de proteína total de esa muestra. Se graficó esta determinación para grupos de muestras sometidas a los diferentes tiempos en que se expusieron al ácido aminooxiacético. Este es el índice de actividad de la enzima, pues la acumulación observada se debe a síntesis, ya que la degradación del neurotransmisor esta inhibida.

2. Experimentos de liberación.

La radioactividad de una muestra o fracción de 4 minutos se expresó como la fracción de liberación estimulada. lo que fué calculado como el cociente de la radioactividad de la muestra entre la radioactividad del tejido al momento de tomar una muestra o sea:

F.L. = Radioactividad presente en una fracción colectada/
Radioactividad del tejido al momento de colectar la
fracción.

El efecto de las diferentes drogas se obtuvo dividiendo la fracción de liberación de las rebanadas expuestas a la droga entre la fracción de liberación de rebanadas no expuestas, pero que se corrieran en paralelo con aquéllas, a este cociente se le denominó cociente de la fracción de liberación (C.F.L.). En el caso de que la liberación de GABA se facilite por efecto de droga, el cociente será mayor de uno, en el caso de lo contrario inhibición, será menor de 1. Las drogas se administraron en pulso en las fracciones 4 a 12.

F. SOLUCIONES Y DROGAS

1. Solución Krebs-Henseleit normal (mM)

NaCl	134.0
KCL	5.0
Ca Cl ₂	2.0
Mg SO ₄	1.0
KH ₂ PO ₄	1.25
NaHCO ₃	25.0
Glucosa	10.0

Esta solución fué preparada tomando los componentes a partir de soluciones madre, y no agregando el CaCl₂, sino hasta haber burbujeado la solución con mezcla gaseosa de CO₂ 5% y Oxígeno al 95 % durante 20 minutos. Se continuó el burbujeo con la mezcla gaseosa durante todo el experimento manteniéndose la solución a 37 grados. Después del equilibrio (20 minutos) se midió el valor del Ph y se ajustó a 7.4. En los casos en que agregaron a las soluciones dopamina o agentes dopaminérgicos se añadieron 50 uM de metabisulfito de Na por litro de solución con el objeto de evitar la oxidación de estos compuestos.

2. Solución Krebs 15 mM K (despolarizante).

NaCl	55.58 mM
Na ₂ SO ₄	39.21 mM
K ₂ SO ₄	6.87 mM
KH ₂ PO ₄	1.25 mM
CaCl ₂	2.0 mM
Mg SO ₄	1.0 mM
Glucosa	10.0 mM

Esta solución despolarizante se preparó incrementando a 15 mM el K manteniendo el producto [K][Cl] constante (para evitar el posible inchamiento de la preparación por la redistribución de K y Cl según el principio de Donnan). La osmolaridad se compenso con sacarosa hasta ser igual a la del Krebs normal.

3. Solución de centelleo (por litro de solución)

Tolueno	667.0 ml
Triton x-100	333.0
P.P.O *	4.0 g
P.O.P.O.P. **	0.200 g

* 2.5-Difenil-oxazol

** 1.4-bis-2-(5-fenil-oxazol)-benzeno

Se mezclaron los ingredientes hasta obtener una mezcla homogénea

4. Fases Cromatográficas.

Fase Móvil para dopamina

Monocloroacetato de Sodio	ph= 3	0.15 M
Acetonitrilo		3.5 %
Tetrahidrofurano		1.8 %
Alquil Sulfato de Na.		.125 %

Fase Móvil para GABA

KH ₂ PO ₄	ph =3	0.5 M
Metanol		5.0 %
Reactivo de Fluorescencia		
Acido Borico	ph = 10	0.1 M
Reactivo de Brig		5 ml
Mercaptoetanol		6 ml

OPT *

500 mgrs

* 0-heptaldehido.

5. Drogas:

3H-GABA radioactivo. (Amersham. Co.)

b-alanina

ácido nipecótico

Meta-bisulfito de Na

Dopamina

SCH 23 390

l-sulpiride

l-dopa

SKF 39393

NSD 1015

dl-metanfetamina

ácido aminooxiacético

ácido perclorico

G. ANALISIS ESTADISTICO.

Las curvas de acumulación de GABA, en ratas normales y desnervadas, sometidas a diferentes condiciones experimentales, fueron analizadas siguiendo el metodo de Análisis de Varianza (ANDEVA) , para valores promedios de acumulación obtenidos para los diferentes tiempos.

En los experimentos de liberación se analizaron los diferentes periodos de exposición a las drogas usando Analisis de Varianza (ANDEVA) de bloques y seguida de prueba de Duncan para determinar la diferencia estadística en los grupos sometidos a drogas.

VIII RESULTADOS

A. EVALUACION DEL MODELO DE LESION UNILATERAL DE LA SUSTANCIA NEGRA PARS COMPACTA CON 6 HIDROXIDOPAMINA.

De acuerdo a nuestra estrategia experimental, en algunos casos utilizamos rebanadas provenientes de sustancia negra reticulata obtenidas de ratas con lesión de la pars compacta provocada con 6-hidroxi-dopamina, de tal manera que estas no presenten dendritas dopaminérgicas. En esta sección de los resultados mostramos la manera en que se determinó el grado de lesión de las ratas, con el objeto de seleccionarlas a priori para los experimentos.

1. Efecto de la lesión con 6 hidroxi-dopamina en la pars compacta sobre el contenido nigral y estriatal de dopamina.

En estos experimentos se realizó una determinación de los contenidos estriatales y nigrales de dopamina, con el objeto de conocer la magnitud de la denervación que se logra por la lesión de la pars compacta, sobre estas dos estructuras que son los sitios de proyección de las neuronas dopaminérgicas (Carpenter 1984). También sirvió para conocer si la medida del contenido de dopamina en el cuerpo estriado correspondía con la de la sustancia negra reticulata en los casos de lesión. Los resultados se muestran en la gráfica 1. En ellos se muestra el resultado obtenido de un grupo de 6 ratas lesionadas. Los

contenidos se encuentran expresados en picogramos de dopamina por microgramos de proteína. Nótese cómo en el lado lesionado existe una disminución significativa ($p = 0.001$ t de student) del contenido de dopamina con respecto del lado control, tanto en la pars reticulata como en el núcleo estriado. La magnitud del porcentaje de lesión en ambas estructuras es similar: $92 \pm 4\%$ en el estriado vs $89 \pm 3\%$ en la sustancia negra (ver sección de métodos para el cálculo del porcentaje de lesión). Cabe aclarar que en ratas normales no existe diferencia entre los contenidos de dopamina nigral y estriatal cuando se comparan en ambos lados (datos del laboratorio no mostrados en esta tesis).

2. Correlación entre la conducta de giro inducida por metanfetamina y el porcentaje de lesión de los animales desnervados.

En estos experimentos se realizó una correlación entre la velocidad de giro que induce la metanfetamina en los animales lesionados, con el porcentaje de lesión calculado a partir de las determinaciones de dopamina efectuadas en el núcleo estriado dos semanas después de la cirugía. La velocidad de giro se evaluó una hora después de administrada la droga. Los resultados de 42 animales operados se muestran en la gráfica 2. Nótese como aproximadamente a partir del 70% de grado de lesión, la velocidad de giro se incrementa proporcionalmente de manera lineal con respecto del porcentaje de lesión. La línea recta que mejor se ajusta presenta un índice de regresión de 0.84 (método

de los mínimos cuadrados).

B) EXPERIMENTOS DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD.

En esta sección de los resultados se encuentra la caracterización de la actividad de la GAD en rebanadas de sustancia negra y el efecto que la activación de receptores dopaminérgicos D-1 y la l-dopa tuvieron sobre ella.

1. Efecto del ácido aminoacético (AAOA) sobre el contenido nigral de GABA en rebanadas de ratas normales.

Estos experimentos muestran el resultado de la actividad de la GAD en rebanadas de sustancia negra de ratas normales por el método descrito. Las muestras de rebanadas de sustancia negra fueron incubadas a diferentes tiempos en presencia de 10 μM de AAOA o vehículo. Al final del periodo se determinó el contenido de GABA como se indicó en la sección de métodos. La maniobra condujo a la acumulación de GABA, ver gráfica 3, debido al bloqueo de la degradación de GABA que produce la droga, y a que la síntesis permanece activa en las terminales nerviosas (Pasantes y Aréchiga 1984). La acumulación se observa desde los 5 minutos y es estadísticamente significativa desde los 10 ($p=0.005$ ANDEVA), con respecto del periodo control ($t=0$ minutos). De inicio hay un incremento casi lineal que llega al máximo a los 20 minutos y se mantiene sin cambio aparente aún después de los 60 minutos (sin diferencia estadísticamente

significativa entre los grupos 20, 40 y 60 minutos ANDEVA). Las rebanadas que no son sometidas a la acción del AAOA, no presentan cambios significativos en el contenido de GABA, aún después de 60 minutos de iniciada la administración de la droga al grupo experimental (t=0 6.45 +/- 0.33 ug GABA/mg proteína, t=60 6.44 +/- 0.15 ug GABA/mg proteína n= 4 en cada caso).

2. Efecto de la denervación sobre la acumulación de GABA producidas por AAOA.

Estos experimentos se efectuaron para determinar si la inervación dopaminérgica que se encuentra en la rebanadas de ratas normales, ejerce una acción moduladora sobre la actividad de la GAD, para lo cual se estudio la acumulación de GABA en rebanadas de sustancia negra reticulata provenientes de ratas desnervadas de su aferencia dopaminérgica. Los experimentos se realizaron comparativamente tanto en el lado normal como en el denervado, en ratas de dos semanas de lesión ver gráfica 4. En el lado normal se presentó una acumulación de GABA igual a la de las ratas no operadas de la sección anterior, pero en el lado denervado sólo hubo un ligero incremento del contenido de GABA que no es diferente estadísticamente con respecto de t=0 para ninguno de los tiempos estudiados (evaluados por el método de ANDEVA).

Para destacar que la disminución en la acumulación se debe a la disminución de la dopamina en el lado denervado y no al trauma quirúrgico de la lesión, los mismos experimentos se realizaron en un grupo de ratas pseudoperadas a las cuales se les administró en la cirugía de lesión el vehículo, pero no la neurotoxina, ver gráfica 5. Nótese como en estas ratas en el lado operado igual que en el control hay una acumulación normal de GABA en respuesta a la administración del AAOA, lo que sugiere que la desaparición de la inervación dopaminérgica es la responsable de este efecto. Estas ratas no presentaron disminución del contenido estriatal de dopamina en el lado operado con respecto del lado normal, ni desarrollaron conducta de giro en respuesta a la metanfetamina (datos no mostrados).

3. Efecto del SKF 38393 sobre la acumulación de GABA inducida por AAOA en rebanadas de ratas denervadas.

En estos experimentos se exploró el efecto que tiene la activación de receptores dopaminérgicos del subtipo D-1 por el agonista selectivo SKF 38393, sobre la acumulación de GABA que produce el AAOA. La droga se administró conjuntamente con el AAOA a tres diferentes tiempos (10, 20 y 60) a la concentración de 10 μ M, tanto en el lado normal como en el denervado. Los resultados se muestran en la gráfica 6.

Para $t=10$ minutos el SKF produjo un incremento significativo en la acumulación de GABA en la rebanadas del lado denervado (Contenido de GABA control = 4.97 ± 0.81 vs SKF= 9.33 ± 0.43 , $n=6$ $p=0.001$ ANDEVA) y un ligero incremento, aunque no estadísticamente significativo en las del lado control (Contenido de GABA control = 11.80 ± 2.02 vs SKF 14.99 ± 2.38 , $n=6$).

Para $t=20$ minutos la droga provocó un efecto similar en el lado denervado (Contenido de GABA control 5.43 ± 0.75 vs SKF= 10.02 ± 1.38 $p=0.001$ $n=6$ ANDEVA), observándose un ligero incremento en el lado normal que no alcanzó significancia estadística. (Contenido de GABA control= 15.15 ± 2.81 vs SKF= 16.24 ± 2.06 $n=6$ ANDEVA). Aunque el incremento debido al SKF para el lado denervado pareciera un poco mayor que para el caso de $t=10$ este no alcanzó significancia estadística (Contenido de GABA lado denervado en presencia de SKF $t=10$: 9.33 ± 0.43 vs $t=20$: 10.02 ± 1.38 $n=6$ ANDEVA).

Por último para $t=60$ la droga produjo un incremento en el lado denervado, semejante para su correspondiente en $t=10$ y $t=20$ (Contenido de GABA lado denervado en presencia de SKF $t=10$ 9.33 ± 0.43 , $t=20$ 10.02 ± 1.36 y $t= 60$ 10.37 ± 0.63 $p= 0.05$ ANDEVA $n=6$ en cada caso), en tanto que no modificó la acumulación en el lado normal.

En resumen la droga parece estimular la acumulación de GABA en el lado denervado de manera similar en el tiempo sin grandes modificaciones respecto lado normal. Cabe aclarar que la administración de SKF sin AAOA ni en el lado normal ni en el lesionado modifica per se el contenido de GABA (datos no mostrados).

4. Antagonismo del efecto del SKF y la dopamina sobre la acumulación de GABA por el SCH 23 390.

Con objeto de mostrar que el efecto del SKF en el lado denervado está mediado por receptores D-1 y que la dopamina es capaz de mimetizar el efecto de la activación de estos receptores, se realizaron experimentos en los que se estimuló la acumulación de GABA por SKF y por dopamina, solos y en presencia del antagonista selectivo de receptores D-1 el SCH 233390 lo mismo se probó el antagonista de los receptores D-2 l-sulpiride. Se usaron rebanadas del lado denervado con tiempo exposición de 10 minutos a las drogas.

Los resultados se muestran en la gráfica 7 y 8 . La estimulación de receptores D-1 por el SKF (1 μ M) y la dopamina (10 μ M) produjo un incremento significativo de la acumulación de GABA en presencia de AAOA. Este efecto es bloqueado totalmente por el SCH 23 390 (1 μ M) pero no por el L- sulpiride en ninguno de los casos (Contenido de GABA SKF = 10.25 +- 0.67 vs SKF + SCH = 7.37 +- 0.44 p=0.001 n=6 ANDEVA; Contenido de GABA dopamina = 10.44 +- 0.49 vs dopamina + SCH 6.72 +- 0.32 p=0.001 n=6 ANDEVA).

5. Efecto de la l-dopa sobre la acumulación de GABA inducida por AAOA en rebandas de ratas denervadas. Antagonismo del SCH 23390.

Estos experimentos se realizaron con objeto de determinar si la l-dopa mimetiza la acción de la dopamina y el SKF, sin ser descarboxilada, para lo cual se realizaron en presencia de NSD 1015. La l-dopa también incrementó la acumulación de GABA inducida por AAOA (contenido de GABA control 6.20 ± 0.15 vs l-dopa 10.90 ± 0.15 $p=0.001$ $n=6$ t-student) ver gráfica 9. De manera similar el efecto fué claramente antagonizado por el SCH 23390, pero no por el l-sulpiride (contenido de GABA SCH 23390 6.30 ± 0.12 y l-sulpiride 10.53 ± 0.12).

C. EXPERIMENTOS DE LIBERACION.

En estos experimentos de acuerdo a los objetivos planteados estudiamos la participación de la dopamina en la liberación de GABA, así como la activación de receptores D-1 dopaminérgicos presinápticos, la acción de la l-dopa y la metanfetamina.

1. Efecto de la estimulación con alto K sobre la liberación de GABA radioactivo en rebanadas de pars reticulata de la sustancia negra de la rata. Obtención del cociente de la fracción de liberación.

La gráfica 10 muestra la liberación fraccional de GABA radioactivo proveniente de rebanadas de ratas denervadas, en respuesta a la depolarización con alto K (15 mM). La exposición continua a la despolarización produjo una prolongada liberación de radioactividad manifestada por un incremento en la fracción de liberación. Hay un aumento claro de radioactividad de las fracciones 1 y 2 que declina a medida que se progresa en la toma de las fracciones, pero siempre por encima de la liberación basal (que corresponde al 0 en las gráficas).

En la parte inferior se graficó el promedio de cocientes de la fracción de liberación correspondientes de pares de determinaciones de muestras corridas al mismo tiempo. Obsérvese como en todas las fracciones el cociente oscila alrededor de 1, esto indica la homogeneidad de la liberación de GABA de muestras perfundidas en paralelo.

2. Efecto de la dopamina sobre la liberación de GABA inducida por K en la pars reticulata de la sustancia negra. Antagonismo de SCH 23 390.

Estos experimentos exploraron la acción de la dopamina sobre la liberación de GABA y si el efecto se debe a la activación de receptores D-1. En la gráfica 11, en A puede verse que la aplicación de un pulso de dopamina de las fracciones 5 a la 12 produce un incremento en el cociente de la fracción de liberación (C.F.L.= 1.76 ± 0.04 n=5 p=0.001), lo que indica facilitación de la liberación de GABA en estas condiciones. La facilitación se hace evidente al administrar la droga y se mantiene mientras está presente en el líquido de perfusión para revertirse paulatinamente al eliminar la droga.

El bloqueo selectivo de los receptores dopaminérgicos del tipo D-1 por el SCH 23 390 produjo un bloqueo de la facilitación que produce la dopamina como se ve en la sección B de la misma gráfica, ya que la coadministración de la dopamina no produjo incremento en el valor del cociente de la fracción de liberación (C.F.L.= 1.00 ± 0.03 n=5 dopamina + SCH). El bloqueo selectivo de los receptores dopaminérgicos D-2 por el l-sulpiride no bloqueó la acción facilitadora de la dopamina, y la administración conjunta de la dopamina con la droga no modificó significativamente el valor de C.F.L. que se obtiene únicamente con la dopamina (C.F.L. = 1.75 ± 0.03 n=4 p= 0.01 con respecto del control) véase la parte C de la misma gráfica.

3. Efecto de la L-dopa sobre la liberación de GABA inducida por K en la pars reticulata. Antagonismo de receptores D-1. Acción del NSD.

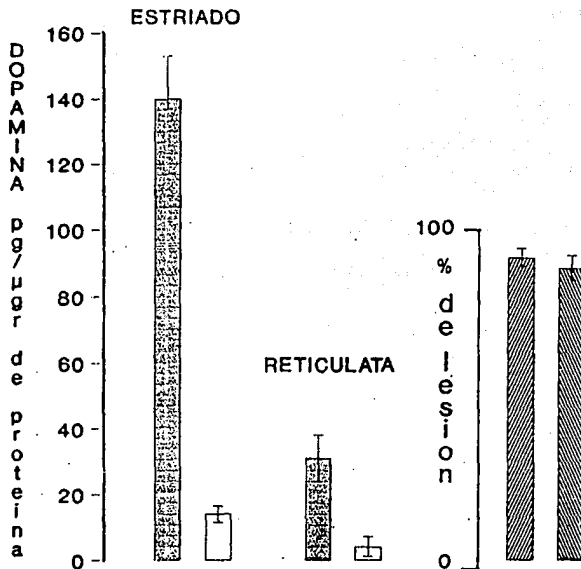
Estos experimentos se diseñaron con el objeto de estudiar si la l-dopa es un agente farmacológico capaz de activar por si mismo (y no a través de su conversión a dopamina) los receptores D-1 presinápticos de la sustancia negra.

Los resultados de la gráfica 12 sección A muestran que la administración de L-dopa en forma de pulso de las fracciones 4 a la 12 produjo una facilitación de la liberación de GABA similar a la que produjo la dopamina (C.F.L.= 1.70 +- 0.04). Puede verse en B que la inhibición de la dopa descarboxilasa (enzima que produce la conversión de l-dopa a dopamina) por la hidrazina NSD 1015 no modificó la facilitación de la liberación por la l-dopa (C.F.L. 1.75 +- 0.05). El efecto de la l-dopa fué bloqueada por la administración conjunta del antagonista selectivo de receptores D-1 el SCH 23 390 (1.03 +- 0.05) como se observa en C. Por último notese en D como el l-sulpiride no bloqueó la acción facilitadora de la dopamina (1.70 +/- 0.07).

4. Efecto de la metanfetamina sobre la liberación de GABA en la pars reticulata de la sustancia negra. Bloqueo de receptores D-1.

Las anfetaminas son fármacos capaces de evocar la movilización de dopamina de las terminales sinápticas, además de bloquear el sistema de recaptura de la misma (Parker y Cebeddu 1988), lo que las ha convertido en una herramienta farmacológica importante para el estudio de los efectos mediados a través de dopamina endógena. En nuestro estudio probamos el efecto de la d-metanfetamina sobre la liberación de GABA de rebanadas de ratas normales, para ver si la dopamina endógena proveniente de las dendritas que se encuentran intactas en estas muestras, era capaz de estimular también la liberación de GABA. Los resultados se muestran en la gráfica 13. En rebanadas de ratas normales la anfetamina (100 μ M) produjo una estimulación paulatina de la liberación espontánea de GABA que alcanzó un máximo de 30% a los 16 minutos de aplicada, y que regreso a valores control cuando se suspendió la administración, ver sección A. La estimulación de la liberación fué bloqueada por el SCH 23 390 administrado conjuntamente (C.F.L.B = 1.29 \pm 0.03 n=6 anfetamina sola VS C.F.L.B. = 1.03 \pm 0.03 n=4), ver sección B. La acción de la anfetamina no se observó en las rebanadas de ratas denervadas de dopamina (C.F.L.B = 0.98 \pm 0.01 n=6) ver sección C.

GRAFICA 1

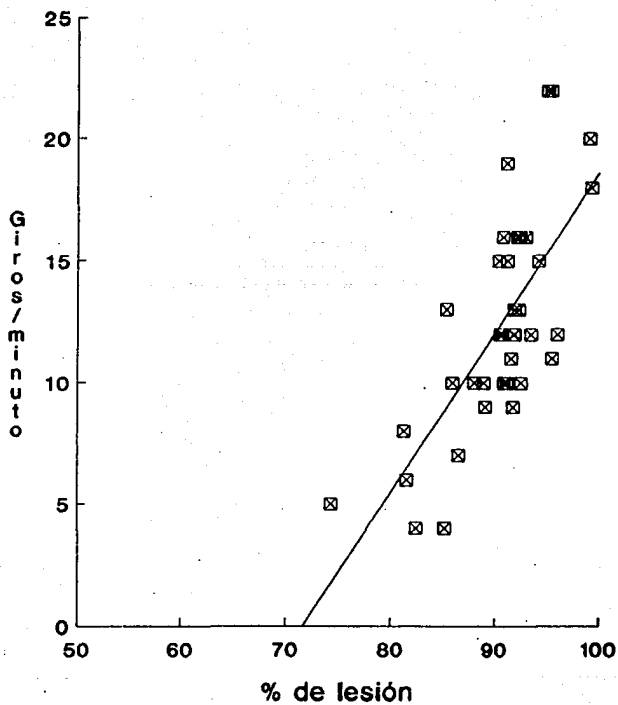


Normal Denervado
Estriado Reticulata

n=6 en cada caso

Gráfica 1. Contenido estriatal y nigral de dopamina en ratas con lesión unilateral de la pars compacta de la sustancia negra. En la parte superior se muestra el contenido estriatal de dopamina expresado en picogramos por microgramo de proteína. En la sección intermedia se muestra lo mismo pero en la pars reticulata de la sustancia negra. Para ambos casos se muestra comparativamente la determinación en el lado control y el lesionado. La parte inferior muestra el porcentaje de lesión calculado para ambas regiones, con los datos de las gráficas superiores. Los resultados representan el promedio \pm error estandard de 6 determinaciones.

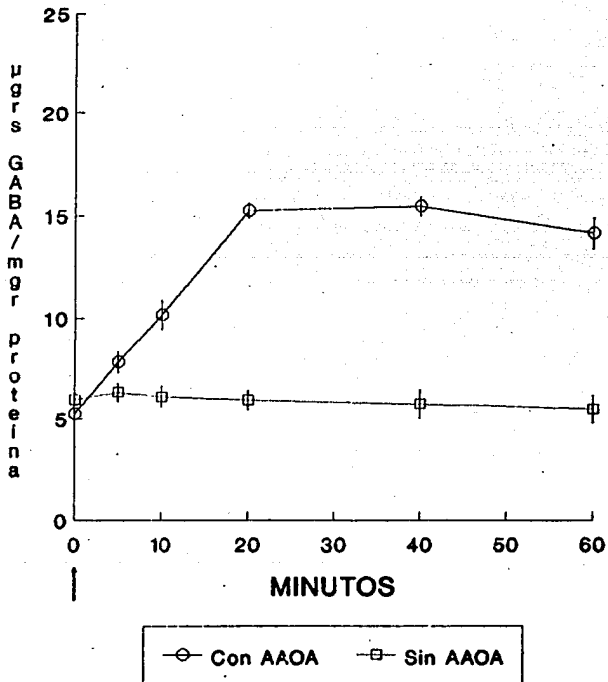
GRAFICA 2



n= 42 r=0.84

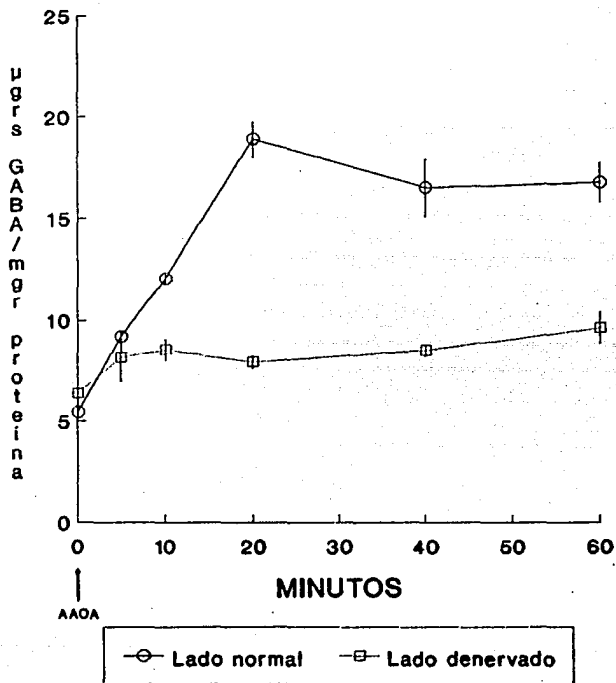
Gráfica 2. Relación entre el porcentaje de lesión y la velocidad de giro inducida por la metanfetamina en ratas desnervadas unilateralmente con 6 hidroxidopamina aplicada estereotaxicamente en la pars compacta de la sustancia negra. Una semana despues de la lesión se determino la velocidad de la conducta de giro administrandose 10 mgrs por kg por vía subcutánea de metanfetamina en solución salina y a la hora se determinó el número de giros por minuto. A la semana siguiente (15 días despues de la lesión) se procedió a la determinación de los contenidos de dopamina estriatal. La gráfica muestra la relación entre las determinaciones del contenido de dopamina expresados como el porcentaje de lesión y la velocidad de giro inducida por la metanfetamina de 42 animales, la recta es la que mejor se ajusta (mínimos cuadrados) a los datos. El porcentaje de lesión se calculó expresando el contenido de dopamina (determinado por HPLC) del lado lesionado como porcentaje del lado indemne. El contenido de dopamina fué expresado en cada caso en picogramos por microgramo de proteína.

GRAFICA 3
RATAS NORMALES



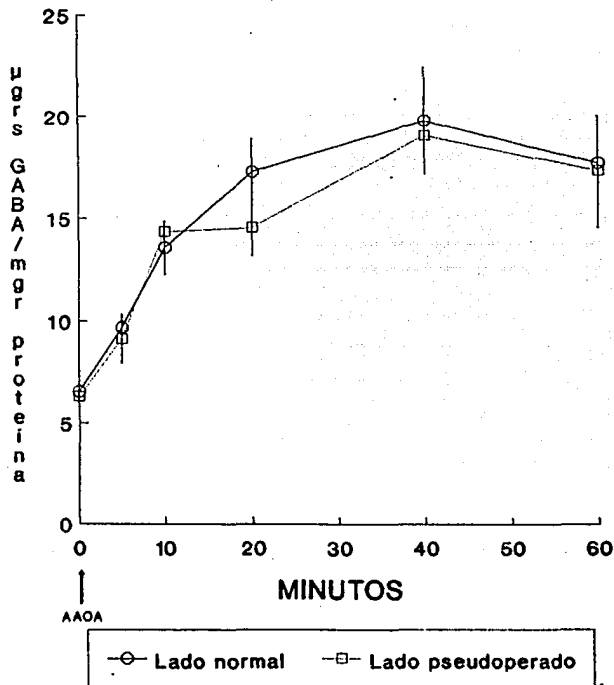
Gráfica 3. Curso temporal de la acumulación de GABA inducida por AAOA en rebanadas de pars reticulata de la sustancia negra de ratas normales. En la gráfica se muestra el contenido nigral de GABA determinado por HPLC y expresado en microgramos por miligramo de proteína de muestras de rebanadas expuestas por diferentes tiempos al ácido aminooxiacético a la concentración indicada. Los controles o sin AAOA se administro solo el vehículo. Los resultados representan el promedio \pm el error estandar de 4 determinaciones por separado.

GRAFICA 4
RATAS LESIONADAS 2 SEMANAS



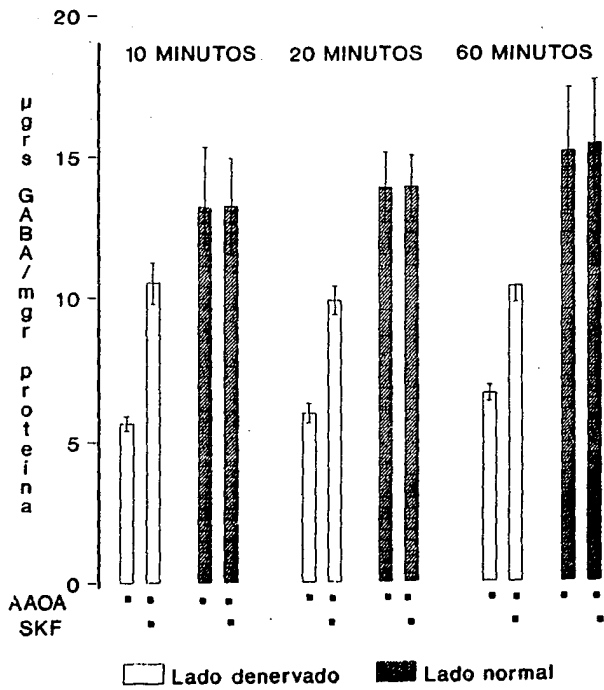
Gráfica 4. Curso temporal de la acumulación de GABA en rebanadas de pars reticulata de ratas desnervadas con 6 hidroxidopamina 2 semanas despues de la cirugía. El contenido de GABA determinado como se indico en los metodos se grafica en las abcisas y en las ordenadas los tiempos de incubación en los que las muestras se expusieron al AAOA. Los resultados representan el promedio +- el error estandar de 4 determinaciones en cada caso. Los círculos blancos son los resultados de las determinaciones en las rebanadas del lado control y los círculos negros los del lado desnervado.

GRAFICA 5
RATAS LESIONADAS 2 SEMANAS PSEUDOPERADAS



Gráfica 5. Curso temporal de la acumulación de GABA inducida por AAOA en rebanadas de pars reticulata de ratas pseudoperadas en la pars compacta de la sustancia negra. En este caso al lado operado se le administro solo el vehiculo y se procedio a hacer las determinaciones. Los puntos representan la media \pm el error estandar de 4 determinaciones por separado. En circulos blancos el lado indemne y en circulos negros las determinaciones en rebanadas de pseudoperadas.

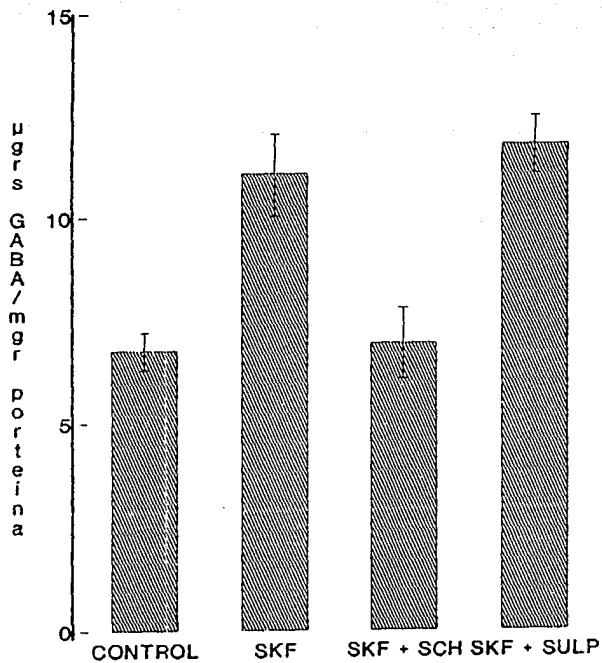
GRAFICA 6



n=6 en cada caso

Gráfica 6. Efecto del SKF 38393 sobre la acumulación de GABA inducida por AAOA en rebanadas de ratas normales y desnervadas a 3 diferentes tiempos. La grafica representa el contenido de GABA en presencia de AAOA y conjuntamente con SKF en rebanadas tanto en el lado control como en el lado desnervado. Las drogas permanecieron en el medio de incubación por 10, 20 y 60 minutos. Los resultados representan el promedio \pm el error estandar de 6 determinaciones.

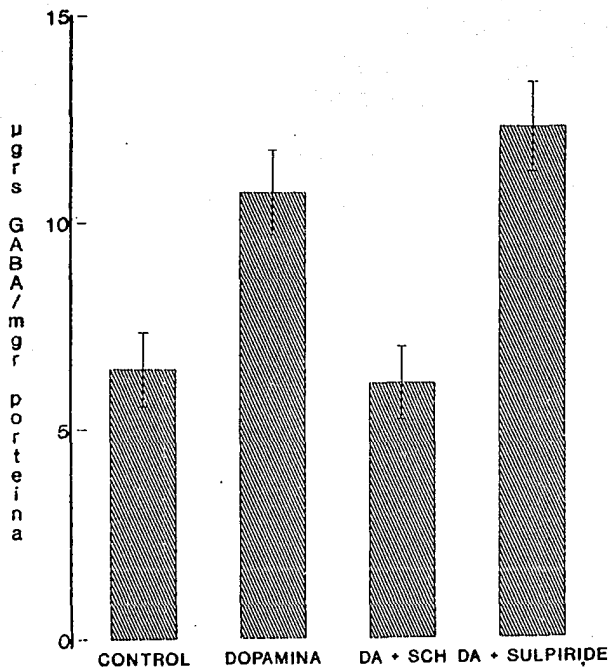
GRAFICA 7
LADO DENERVADO



n=8 en cada caso

Gráfica 7. Antagonismo del efecto del SKF sobre el contenido nigral de GABA por el SCH 23 390 y no por sulpiride. Se muestra en la grafica el resultado de la administración conjunta de los antagonistas selectivos de receptores D-1 y D-2 con el SKF 38393, el tiempo de incubación fué de 10 minutos. Se gráfica el promedio \pm error estandar de 8 determinaciones por separado.

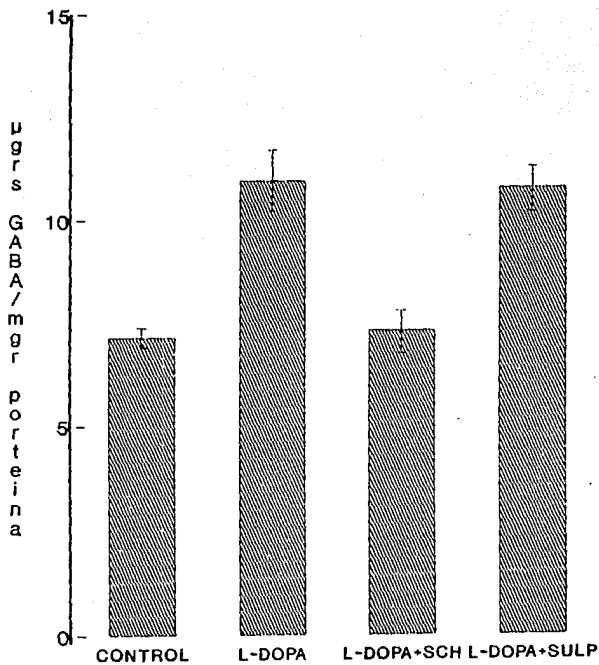
GRAFICA 8 LADO DENERVADO



n=8 en cada caso

Gráfica 8. Efecto de la dopamina y antagonismo por SCH 23390 sobre el contenido nigral de GABA. Se muestra en la gráfica el resultado de la administración conjunta de los antagonistas selectivos de receptores D-1 y D-2 con la dopamina, el tiempo de incubación fue de 10 minutos. Se grafica el promedio + - el error standar de 8 determinaciones por separado.

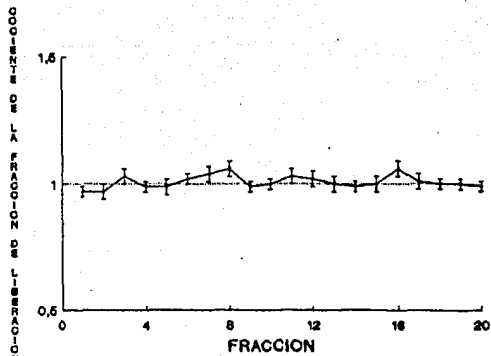
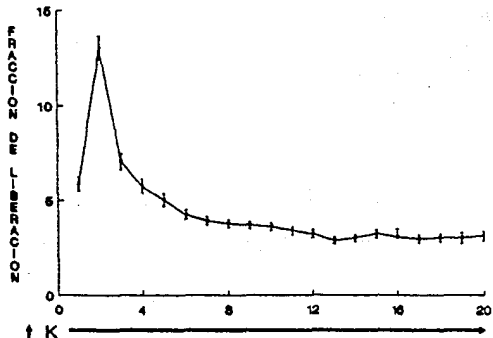
GRAFICA 9
LADO DENERVADO



n°8 en cada caso

Gráfica 9. Efecto de la l-dopa y antagonismo por SCH 23390 sobre el contenido nigral de GABA en rebanadas de ratas denervadas. Se muestra en la gráfica el resultado de la administración conjunta de los antagonistas selectivos de receptores D-1 y D-2 con la l-dopa, el tiempo de incubación fué de 10 minutos y los experimentos se efectuaron en presencia de 500 μ M de NSD 1015. Se grafica el promedio \pm el error standar de 8 determinaciones por separado.

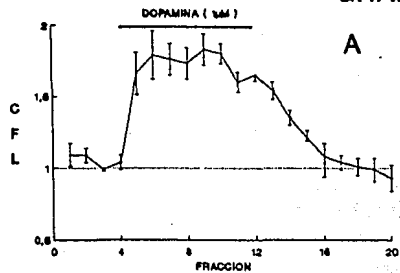
GRAFICA 10



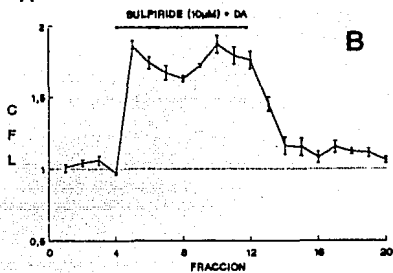
n=26

Gráfico 10. Liberación de GABA radiactivo de rebandas de la parte reticulada de la aerenquia negra inducida por 16 μ l de K. La estimulación se mantuvo durante 60 minutos (20 fracciones). En la parte superior se muestra el incremento de la fracción de liberación. Los valores son el promedio \pm el error estándar (n=50 determinaciones). En la parte de la derecha se muestra el incremento de la fracción de liberación de 25 pares de valores tomados al azar de los gráficos izquierda. Los valores son el promedio \pm el error estándar (n=26 determinaciones).

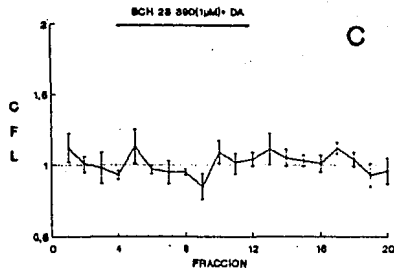
GRAFICA 11



n=8 p<0.005



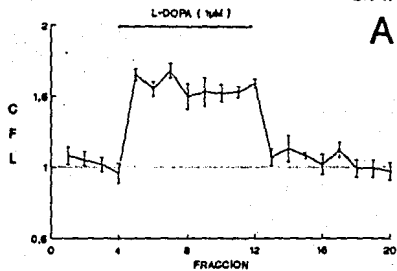
n=8 p<0.005



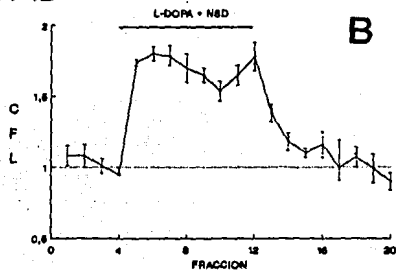
n=8 p<0.005

Gráfica 11. Facilitación de la liberación de GABA por la activación de receptores D-1 en la pars reticulata desnervada de dopamina. En la gráfica A se muestra el efecto de un pulso de dopamina, sobre la liberación de GABA radioactivo inducido por alto K. En B y C se muestra el efecto de la coadministración de dopamina con los antagonistas de receptores D-2 y D-1 respectivamente. Los antagonistas se agregaron al medio de perfusión a las concentraciones arriba indicadas. Los experimentos representan el promedio de 8 determinaciones (cuatro experimentos por separado ± error estándar).

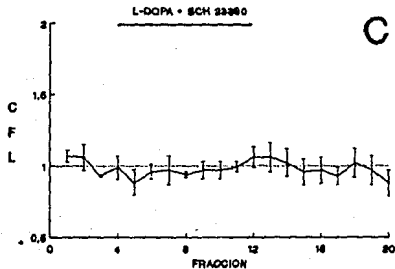
GRAFICA 12



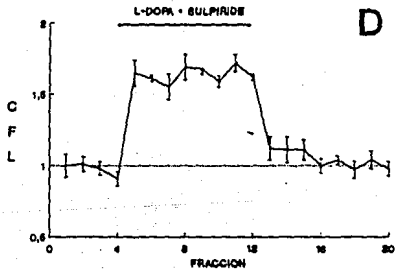
n=6 p<0.006



n=6 p<0.006



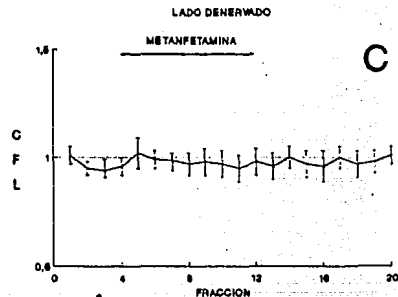
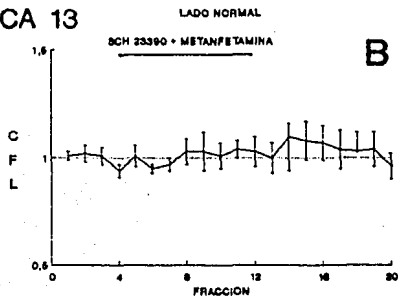
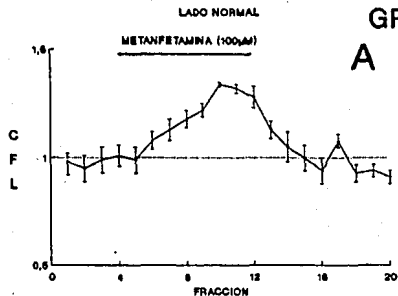
n=6 p<0.008



n=6 p<0.008

Gráfica 12. Facilitación de la liberación de GABA por la L-dopa en la pars reticulata de la sustancia negra de la rata. En A se muestra el efecto de un pulso de l-dopa sobre la liberación de GABA radioactivo inducida por alto K. En B se muestra el efecto de la coadministración de la l-dopa con el inhibidor de la dopa descarboxilasa NSD 1015. En C con el antagonista de receptores D-1 SCH 23 390 y en D con el antagonista de receptores D-2 l-sulpiride. Los experimentos representan el promedio de 8 determinaciones (cuatro experimentos) + - el error estandar.

GRAFICA 13



Gráfica 13. Efecto de la metanfetamina sobre la liberación de GABA radiactivo en la para reticulata de la sustancia negra de ratas normales y denervadas con 6 hidroxidopamina. En la parte superior A se muestra el efecto de la administración de un pulso de metanfetamina 100 µM sola. En B en presencia de SCH 23390. Ambas observaciones en rebanadas de ratas normales. En la gráfica C se muestra la desaparición del efecto del fármaco cuando se administra en rebanadas de ratas denervadas con 6 hidroxidopamina. Se gráfica el promedio ± el error estándar de 4 determinaciones de 4 experimentos realizados por separado.

X DISCUSION

A. EVALUACION DEL MODELO DE LESION.

Como habiamos mencionado en la introducción, para una adecuada evaluación del papel de la dopamina y los receptores D-1 presináuticos que modulan la liberación y síntesis de GABA, era necesario contar con un modelo de lesión confiable, en el que se tuviera la certeza de que se elimina en una alta proporción la inervación dopaminérgica de la sustancia negra compacta, y esto es lo que se realizó en la primera parte de este trabajo.

La inervación dopaminérgica de la sustancia negra y de los ganglios basales en general se origina en la pars compacta, se trata de neuronas del grupo A8 de la clasificación de Ungersted (ver Carpenter 1984), cuyos axones proyectan al cuerpo estriado y sus dendritas forman proyecciones a la pars reticulata adyacente, es por esto que una vez producida la lesión química de las neuronas, hicimos determinaciones del contenido de dopamina en estos dos núcleos. Técnicamente es más fácil la determinación en el cuerpo estriado pues se trata de un núcleo de mayor tamaño y con concentraciones relativamente altas de la amina, es por esta razón que decidimos hacer las determinaciones para el porcentaje de lesión en este núcleo, además de que se trata de la misma proyección que llega a la pars reticulata de la sustancia negra. Sin embargo antes de esto quisimos ver si efectivamente la lesión

producía una caída similar de dopamina en ambos núcleos. Los resultados de la gráfica 1 nos mostraron que efectivamente existe una caída en el contenido de dopamina en ambos núcleos y que el porcentaje de lesión calculado en ambas regiones es el mismo prácticamente.

Ahora bien, sabemos que el método de lesión es aceptable desde el punto de vista bioquímico, pero no quiere decir que sea estándar para todos los animales, ya que de hacer una aplicación deficiente de la droga, o aplicarla en un sitio inadecuado el porcentaje de lesión variaría de animal a animal y modificaría los resultados de los experimentos. Es por esto que tratamos de hacer una correlación con parámetros conductuales que nos permitiera seleccionar a priori a los animales con un rango similar de porcentaje de lesión.

El parámetro deseado fue la conducta de giro que origina la metanfetamina. Está plenamente mostrado en la literatura (ver Ungersted 1971), que los sistemas dopaminérgicos de la rata participan en la simetría postural durante el movimiento, y que la lesión unilateral de la sustancia negra, produce postura asimétrica a la deambulación, lo que se traduce en conducta de giro. La metanfetamina que se administró a los animales provoca liberación de dopamina del sitio contrario de la lesión, lo que a su vez origina estimulación de los sistemas dopaminérgicos de ese hemisferio haciendo que predomine el tono motor y la conducta de giro. La velocidad de la conducta de giro es proporcional al

grado de lesión, como lo mostramos en la gráfica 2. Esta proporcionalidad del parámetro conductual y el evento bioquímico es determinante para nuestro trabajo, ya que permite que a través de la conducta de giro se pueda seleccionar un grupo de animales con un rango similar de lesión. De esta manera para el resto de los experimentos mostrados en este trabajo, se seleccionó a las ratas que por conducta de giro mostraron más de 12 giros por minuto lo que corresponde al 90% de grado de lesión o más. Las ratas con giros por debajo del límite fijado fueron descartadas para los experimentos.

En resumen contamos hasta este momento con una metodología adecuada para la selección de animales a priori. Por último cabe señalar que la lesión química de la pars compacta de la sustancia negra es un modelo experimental equivalente a la enfermedad de Parkinson, por lo que resulta de utilidad en estudios sobre fisiopatología de la enfermedad y en consecuencia los resultados mostrados aquí también contribuyen a ello.

B. LA ACCION DE LA DOPAMINA EN LA SINTESIS Y LIBERACION DE GABA EN LA SUSTANCIA NEGRA.

Nuestros resultados apoyan la idea de que la dopamina modula la síntesis por un lado y la liberación de GABA por el otro. Este proceso en la pars reticulata de la sustancia negra reviste gran importancia pues parece ocurrir a través de un receptor presináptico del subtipo D-1.

Para el caso de los experimentos de liberación (Gráfica 11), esto parece ser un hecho claro, ya que la denervación a que fueron sometidos las rebanadas evita que al evocar la liberación de GABA, se libere dopamina dendrítica y se active el receptor, pues de no haberse evitado esto, la dopamina exógena agregada al medio de perfusión no hubiese tenido efecto. Por otro lado el antagonismo del efecto de la dopamina por el antagonista selectivo de los receptores D-1 y no el de los D-2 apoya la idea de que el receptor involucrado es el primero y no el segundo siguiendo el criterio farmacológico. Apoyando esta afirmación se encuentran los resultados de Barone y Cols (1989) en los cuales por estudios autoradiográficos se mostró que los receptores D1 presentan una localización presináptica en la sustancia negra (es decir en terminales axónicas) de la rata y nuestro trabajo les asigna en este caso un papel fisiológico al modular la liberación de GABA de las terminales estriado-nigrales.

A pesar de esto surge la pregunta interesante, si la dopamina endógena que liberan las dendritas es también capaz de activar estos receptores. Los resultados de la gráfica 12 indican que esto si acontece, ya que la anfetamina en rebanadas de ratas normales al movilizar dopamina de las dendritas, estimula la liberación de GABA y este efecto se bloquea por el SCH 23390, más aun cuando se produce la denervación, la anfetamina deja de

ejercer su efecto, debido a que no hay dendritas de donde producir la liberación de dopamina. En resumen los hallazgos sugieren que la dopamina exógena mimetiza la acción de la endógena a través del receptor D-1 presináptico.

Por otro lado ¿ la dopamina determina la síntesis de GABA?. Los datos de las gráficas 4 y 3 así lo sugieren. Primeramente con la técnica descrita se obtiene una acumulación de GABA dependiente del tiempo que refleja la actividad sintética que las terminales tienen del neurotransmisor (ver figura 3) , pues se rompe el círculo síntesis degradación que en condiciones basales se establece en la preparación y que ha sido descrito por otros autores (ver Pasantes y Aréchiga 1984).

Ahora bien en rebanadas de ratas denervadas (gráfica 4) la acumulación no se produce, la única diferencia entre las estas, así como las que provienen del lado no denervado es la ausencia de la dopamina producida por la lesión. En consecuencia la dopamina debe ejercer algún efecto modulador (estimulador), sobre los factores enzimáticos que determinan la síntesis. Como la síntesis de GABA en esta terminales es efectuada por la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), es por lo tanto a este nivel al que se esta produciendo la modulación.

Sin embargo el hecho de la disminución de la síntesis observado por la denervación dopaminérgica no indica el nivel de acción de la dopamina y en esta tesis se propuso que pudiera ser

presináptico, como ocurre para la liberación. Tratando de explorar esto se procedió a la estimulación de receptores presinápticos D-1 con el agonista selectivo SKF 38393 (ver gráfica 6). La dopamina fué inicialmente descartada debido al difícil manejo que presenta pues la oxidación espontánea se produce aproximadamente a los 30 minutos, lo que la invalida para usos por periodos de tiempo prolongados, no obstante en los experimentos de corta exposición como los de la gráfica 8 se usó también.

La estimulación condujo a un incremento en la acumulación de GABA en las rebanadas de ratas denervadas, lo que indica incremento en la actividad biosintética del GABA, sin embargo este incremento significativo no fué capaz de llevar a una recuperación del 100% de de la síntesis a pesar del tiempo prolongado de exposición de la droga. En consecuencia algún otro factor pudiera intervenir modulando la síntesis de GABA a plazo de tiempo más largo. Este podría ser de tipo genómico, pues recientemente se ha mostrado que la dopamina también esta involucrada en la expresión de ciertos genes incluyendo enzimas. No obstante la participación del receptor D-1 presináptico queda apoyada en este hallazgo.

Por criterios farmacológicos, también puede observarse que el receptor involucrado es el D-1, por la acción del SKF (agonista selectivo), y la acción antagonica del SCH y no del sulpiride (antagonista selectivo D-1 y D-2 respectivamente).

ver gráfica 8.

C. LA ACCION DE LA L-DOPA Y LOS RECEPTORES D-1.

De acuerdo con nuestros antecedentes e hipótesis, existen sugerencias de la literatura de que la l-dopa mimetiza acciones mediadas por receptores D-1, existe también controversia si la l-dopa es convertida a dopamina en terminales nerviosas dopaminérgicas remanentes y reemplaza la deficiencia observada en pacientes parkinsonianos así como en modelos experimentales. Por último se ha observado que la l-dopa estimula la actividad de la GAD e incrementa el nivel de GABA en el líquido céfalo raquídeo de los pacientes con enfermedad de Parkinson.

Tratando de resolver estas discrepancias fue que nos planteamos la presunta ¿ es la l-dopa un agonista dopaminérgico D-1 ?. Los experimentos de las gráficas 9 y 11 tratan de apoyar esta idea. En el modelo como el que presentamos donde la síntesis y liberación de GABA están modulados por dopamina exploramos si la l-dopa es capaz de mimetizar este efecto. Los resultados tanto de liberación como de síntesis mostrados en las gráficas indican que

la l-dopa mimetiza la acción de la dopamina, pues estimula la liberación y síntesis de GABA por un efecto mediado a través de receptores D-1 ya que el SCH 23390 fué capaz de antagonizar su efecto igual que el de la dopamina. Sin embargo esto no responde la pregunta de si el efecto se media o no por su conversión a dopamina, la respuesta se mostró en el mismo grupo de experimentos que se realizaron en presencia de NSD. La administración de la droga (que previene la conversión de dopa a dopamina) no modificó la respuesta a la l-dopa. Mas aún los experimentos de síntesis se efectuaron en presencia de NSD.

En consecuencia estos datos refuerzan esta idea de la acción de la l-dopa, sugieren un mecanismo directo farmacológico para explicar el aumento de actividad de la GAD y el nivel de GABA en el líquido céfalo raquídeo de los parkinsonianos.

XI CONCLUSIONES

1.- Los receptores D-1 presinápticos de la sustancia negra pars reticulata al ser activados por dopamina, incrementan o facilitan la liberación y síntesis de GABA en las terminales estriado nigrales

2.- La l-dopa parece mimetizar las acciones de la dopamina sobre los receptores D-1 presinápticos, sin necesidad de ser convertida a dopamina por las terminales remanentes.

XII BIBLIOGRAFIA

- Abbott, R.J., Pye, I.F., and Nahorsky, S.R. CSF and plasma GABA levels in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. & Psychiat.*, 45 : pp 253-256, 1982.
- Aceves, J., and Cuello, C. Dopamine release by electrical stimulation of microdissected caudate-putamen and substantia nigra of the rat brain. *Neurosci.*, 6 : pp 2069-2068, 1981.
- Araki, M., McGeer, P.L., and McGeer, E.G. Striatonigral and pallidonigral pathways studied by a combination of retrograde horseradish peroxidase tracing and a pharmacohistochemical method for γ -aminobutyric acid transaminase. *Brain Res.*, 331: pp 17-24, 1985.
- Bak, I.J., Choi, W.B., Hassler, R., Usunoff, K.G., and Wagner, A. Fine structural synaptic organization of the corpus striatum and substantia nigra in the rat and cat. In *Advances in Neurology.*, 9 pp 25-41, edited by D.B. Calne, T.N. Chase and A. Barbeau. Raven Press, New York 1975.
- Barker, R. A. Parkinson's Disease: An autoimmune process. *Int. J. Neurosci.*, 43 : pp 1-7, 1988.
- Barone, P., Tucci, I., Parashos, S.A., and Chase, T.N. D-1 dopamine receptor changes after striatal quinolinic acid lesion. *Kur. J. Pharmac.*, 138 : pp 141-145, 1987.
- Beckstead, R.M. Association of dopamine D1 and D2 receptors with specific cellular elements in the basal ganglia of the cat: the uneven topography of dopamine receptors in the striatum is determined by intrinsic striatal cells, not nigrostriatal axons. *Neurosci.* 1988.
- Beninato, M., and Spencer, R.F. The cholinergic innervation of the rat substantia nigra: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Exp. Brain Res.*, 72: pp 178-184, 1988.
- Bernasconi, R., Maitre, L., Martin, P., and Raschdorf, F. The use of inhibitors of GABA-transaminase for the determination of GABA turnover in mouse brain regions: An evaluation of aminooxyacetic acid and gabaculine. *J. Neurochem.*, 38 : pp 57- 66, 1982.

- Bjorklund, A., and Lindvall, O. Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons suggests a role in dendritic terminals. *Brain Res.*, 83 : pp 531, 1975. Bolam, J.P. and Izzo P.N. The postsynaptic targets of substance P-immunoreactive terminals in the rat striatum with particular reference to identified spiny striatonigral neurons. *Exp. Brain Res.*, 70: pp 361-377, 1988.
- Brown, J.R., and Arbuthnott, G.W. The electrophysiology of dopamine (D2) receptors: a study of the action of dopamine on corticostriatal transmission. *Neurosci.*, 10 : pp 349-355, 1983.
- Carlson, J.H., Bergstrom, D.A., and Walters, J.R. Stimulation of both D1 and D2 dopamine receptors appears necessary for full expression of postsynaptic effects of dopamine agonist: a neurophysiological study. *Brain Res.*, 400: pp 205-218, 1987.
- Carpenter, M.B. Interconnections between the basal ganglia and the brain stem. In *Advances in Behavioral Biology. The Basal Ganglia*. Edited by J. McKenzic, R.E. Kermm and L.N. Wilcok. Plenum Press, 1984.
- Chesselet, M. F. Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain. *Neurosci.*, 12 : pp 347-375, 1984.
- Cooper, D.M.F., Bier-Lanning, C.M., Halford, M.K., Ahghanian, M.K., and Zahniser, N. R. Dopamine acting through D-2 receptor, inhibits rat striatal adenilate cyclase by a GTP dependent. *Procs. Mol. Pharmacol.* 29: pp 113-119, 1986
- Deniau, J.M., Kitai, S.T., Donoghue, J.P., and Grofova I. Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. *Exp. Brain Res.*, 47 : pp 105- 113, 1982.
- Dray, A. The physiology and pharmacology of mammalian basal ganglia. *Progg. Neurobiol.*, 14: pp 221-335, 1980.
- Floran, B., Silva, I., Nava, C., and Aceves, J. Presynaptic modulation of the release of GABA by GABA A receptors in pars compacta and by GABA B receptors in pars reticulata of the rat sustantia nigra. *Eur. J. Pharmac.*, 150 : pp 277, 1988.
- Fujiwara, H., Kato, N., Shuntoh, H., and Tanaka, Ch. D-2 Dopamine receptor mediated inhibition of intracelular calcium mobilization and release of acetylcholine from guinea pig neostriatal slices. *Br. J. Pharmac.* 91 : pp 287-297, 1987.

- Gerfen, C.H. The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature*, 311 : pp 461-464, 1984.
- Gerfen, C.H. The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 236 : 454-476, 1985.
- Graybiel, A.M. Correspondence between dopamine islands and striosomes of the mammalian striatum. *Neurosci.* 13: pp 1157-1187, 1984.
- Hattori, T., Fibiger, H.C., and McGeer, P.L. Demonstration of a pallido-nigral projection innervating dopaminergic neurons. *J. Comp. Neur.*, 162 : pp 487-504, 1975.
- Hattori, T., McGeer, P.L., Fibiger, H.C., and McGeer, E.G. On the source of GABA containing terminals in the substantia nigra. Electron microscopic autoradiographic and biochemical studies. *Brain Res.*, 54 : pp 103-114, 1973.
- Hattori, T., McGeer, P.L., and McGeer, E.G. Dendro axonic neurotransmission. II. Morphological sites for the synthesis, binding and release of neurotransmitters in dopaminergic dendrites in the substantia nigra and cholinergic dendrites in the neostriatum. *Brain Res.*, 170 : pp 71-83, 1979.
- Herrman, P.C. and Langer S.Z. Presynaptic Receptors Dopaminergic and their role in the regulation of transmitter release. *Br. J. Pharmac.*, 60: pp 481-497, 1982.
- Jimenez-Castellanos, J., and Graybiel A.M. The dopamine-containing innervation of striosomes: nigral subsystems and their striatal correspondents. *Soc. Neurosci. Abst.*, pp 1249, 1985.
- Juraska, J.M., Wilson C.J., and Groves P. M. The substantia nigra of the rat: A Golgi study. *J. Comp. Neurol.*, 172 : pp 585-600, 1977.
- Justice, J.B., Nicolaysen and Michael, A. Modelin de dopaminergic nerve terminal. *J. Neurosci.* 22 : pp 239-252, 1988.

- Karoun, F., Freed, W.J., Chuang, L., Cannon-Spoor, E., Wyatt, R.J. and Costa, E. D-dopa and L-dopa similary elevate brain dopamine and produce turning behaviour in rats. *Brain Res.*, 440 : pp 190-194, 1988.
- Kelly, K., Wilcocks, A. L., and Nahorsky, S.R. Neuchemical and Behavioural evidence that dopamine D-2 receptors in the striatum couple to the Ni regulatory protein and inhibitory of cicle AMP accumulation. *Arch. Pharmac.* 335 : pp 618-623, 1987.
- Krosgaard-Larssen, and Jhonston P.D. GABA agonist and Uptake inhibitors. *Neurotransmission. RBI* :1 pp 1, 1985
- Lacey, M.G., Mercuri, N.B., and North, R.A. On the potassium conductance increase activated by GABA B and dopamine D2 receptors in the rat substantia nigra neurones. *J. Physiol.*, 401 : pp 437-453, 1988.
- Lehmann, J., and Langer, S.Z. The striatal colinergic interneuron: synaptic target of dopaminergic terminals ? *Neurosc.*, 10 : pp 1105-1120, 1983.
- Lopez Antunez, L. El talamo y el cuerpo estriado. En : *Neuroanatomia Funcional del Sistema Nervioso.* Edit. Limusa, Mexico, D.F.1979.
- Magnusson, O.D. Comparison of the dopamine D-1 and D-2 antagonist on rat striatal, limbic and nigral dopamine sintesis and utilization. *J. Neural. Transm.* 69: pp 163-167, 1987.
- Mestikawy, S.R., Glowinski, J., and Hamon, M. Presynaptic dopamine autorceptors control tyrosine hydroxylase activation in depolarized striatal dopaminergic terminals. *J. Neurochem.*, 46 : pp 12-22, 1986.
- Nakanishi, H., Kita, H., and Kitai, S.T. Intracellular study of rat substantia nigra pars reticulata neurons in an in vitro slice preparation: electrical membrane properties and response characteristics to subthalamic stimulation. *Brain Res.*, 437 : pp 45-55, 1987.
- Nauta, W. J. H., and Domesik, V.B. Afferent and efferent relationships of the basal ganglia. In Evered and M. O. O'Connor (Eds). *Funtions of the basal ganglia.* Pitman, London, 1984 .

- Nitsch, C., and Riesenbergr, R. Immunocytochemical demonstration of GABAergic synaptic connections in rat substantia nigra after different lesions of the striatonigral projections. *Brain Res.*, 464 : pp 127-142, 1988.
- Olianas, M.C., and Onali, P. Pertussis Toxin attenuates D-2 inhibition and enhances D1 stimulation of adenylate cyclase by dopamine in rat striatum. *J. Neurochem.* 48 : pp 1443-1447, 1987.
- Pasik, P., Pasik, T., Holstein, G.R., and Saavedra, J.P. Serotonergic innervation of the monkey basal ganglia: an immunocytochemical, light and electron microscope study. In *Advances in Behavioural Biology. The Basal Ganglia*. Edited by J. McKenzic, R.E. Kerm and L.N. Wilco. Plenum Press, 1984.
- Penny, G.R., and Young, M.Z. Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. *Ann. Rev. Neurosc.*, 6 : pp 73-94, 1983. Pinnok, R.D. Hyperpolarizing action of baclofen on neurons in the rat substantia nigra slice. *Brain Res.*, 157 : pp 337-340, 1984.
- Pizzi, M., Kato, N., Angustini, F.D., Da Prada, M., Spano, E., and Haefely, W.E. Dopamine D2 receptor stimulates the inositol triphosphate level of rat striatal slices. *J. Pharmac.* 136: pp 263-269, 1987.
- Rinvik, E., Grofova, I. Observations on the fine structure of the substantia nigra in the cat. *Exp. Brain Res.*, 11 : pp 229-248, 1970.
- Stoof, J. C., De Boer, T., Sminia, P., and Mulder, A.H. Stimulation of D-2 dopamine receptors in the rat neostriatum inhibits the release of acetylcholine and dopamine but not affect the release of γ -aminobutyric acid, glutamate or serotonin. *Kur. J. Pharmac.*, 84 : pp 211-214, 1982.
- Stoof, J.C., and Keabian, J.W. Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Sciences*, 35 : pp 2281-2296, 1984.
- Tanaka, Ch., Kuno, T., Shirakawa, O., Saijoh, K and Kubo, N. Molecular regulatory mechanism of D2 dopamine receptor in the bovine striatum. *J. Pharmac.* 18 : pp 75-84, 1986.

- Tepper, J.M., Sawyer, S.F., Groves, P.M. Electrophysiological identified nigral dopaminergic neurons intracellulary labeled with HRP: Light and microscopic analysis. *J. neurosc.* 7 : pp 2794-2706, 1987.
- Trueman, J.M. and Wooten, G.F. The effects of l-dopa on regional cerebral glucose utilization in rats with unilateral lesion of the substantia nigra. *Brain Res.* 397 : pp 264-274, 1986.
- Ungersted, U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *A. Physiol. Scand. Supp 3* : pp 118, 1971
- Van Den Pol, A.N., Smith, A.D., and Powell, J.F. GABA axons in synaptic contact with dopamine neurons in the substantia nigra: double immunocytochemistry with biotin-pexodise and protein A-colloidal gold. *Brain Res.*, 348 : pp 146-154, 1985.
- Walaas, S.I., Sedvall, G., and Greengard, P. Dopamine-regulated phosphorylation of synaptic vesicle-associated proteins in rat neostriatum and substantia nigra. *Neurosc.*, 29 ; pp 9- 19, 1989.
- Wassel, M., Berod, A., and Sotelo, C. Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra, and their striatal input. Combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. *Neurosc.*, 6 : pp 2125-2138, 1981.
- Waszczak, B.L and Walters, J.R. A physiological role for dopamine modulation of GABA effects in substantia nigra: Supersensitivity in 6-hydroxydopamine rats. *Eur. J. Pharmac.*, 105 : pp 369-373, 1984.
- Zigmond, M.J., Stricker, E.M. Parkinson's disease: studies with an animal model. *Life Sciences*, 35 : pp 5-18, 1984.