

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

18
2es

**EFFECTOS DE LA APLICACION LOCAL DE GALPHIMINA-B
SOBRE LA ACTIVIDAD ELECTRICA DE LAS NEURONAS DEL
AREA VENTRAL TEGMENTAL DE RATAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS (FISIOLOGIA)

P R E S E N T A

J A I M E T O R T O R I E L L O G A R C I A

ASESOR

DR. CRUZ REYES VAZQUEZ

México, D. F.

1998

265229

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



FACULTAD DE MEDICINA
COORDINACION DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

DR. EDUARDO JURADO GARCIA
JEFE DE LA SUBDIVISION DE
MAESTRIAS Y DOCTORADOS
PRESENTE.

Me permito informar a usted que el Subcomité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas acordó designar el siguiente Jurado para el examen de grado como Doctor en Ciencias Biomédicas, área Fisiología del M. en C. JAIME TORTORIELLO GARCIA, quien defenderá la tesis: "EFECTOS DE LA APLICACION LOCAL DE GALPHIMINA-B SOBRE LA ACTIVIDAD ELECTRICA DE LAS NEURONAS DEL AREA VENTRAL TEGMENTAL DE RATAS".

PRESIDENTE:	DRA. HERMINIA PASANTES.
SECRETARIO:	DR. MIGUEL MORALES MENDOZA.
PRIMER VOCAL:	DR. CRUZ REYES VAZQUEZ.
SEGUNDO VOCAL:	DR. MIGUEL PEREZ DE LA MORA.
TERCER VOCAL:	DR. ISMAEL JIMENEZ ESTRADA.
SUPLENTE:	DR. HECTOR PONCE MONTER.
SUPLENTE:	DR. FERMIN VALENZUELA.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de marzo de 1998.


Dr. René Drucker Colín
Coordinador del Programa
de Posgrado en Ciencias
Biomédicas.

C.c.p. Dr. Cruz Reyes Vazquez.-Tutor.-Presente.
M. en C. Jaime Tortoriello García.-alumno.-
Presente.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social en Xochitepec, Morelos.

COMITÉ TUTORIAL

Tutor:

Dr. Cruz Reyes Vázquez.

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina.
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesores:

Dr. Miguel Pérez de la Mora

Instituto de Fisiología Celular.
Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. René Drucker Colin

Departamento de Fisiología.
Facultad de Medicina.
Universidad Nacional Autónoma de México.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE:	Dra. Herminia Pasantes Morales
SECRETARIO:	Dr. Miguel A. Morales Mendoza
PRIMER VOCAL:	Dr. Cruz Reyes Vázquez
SEGUNDO VOCAL:	Dr. Miguel Pérez de la Mora
TERCER VOCAL:	Dr. Ismael Jimenez Estrada
SUPLENTE:	Dr. Hector Ponce Monter
SUPLENTE:	Dr. Fermin Valenzuela Gómez-Gallardo

CONTENIDO

RELACION DE ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	9
I. INTRODUCCION	10
II. ANTECEDENTES	12
a. Aspectos etnobotánicos de <i>Galphimia glauca</i>	12
b. Aspectos farmacológicos de los extractos de <i>Galphimia glauca</i>	15
c. Antecedentes del aislamiento y caracterización de galphimina-B	17
d. Aspectos farmacológicos del compuesto galphimina-B.	19
e. Participación de las neuronas del área ventral tegmental en los procesos mentales cognoscitivos	21
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
IV. HIPOTESIS	32
V. OBJETIVOS	33
VI. MATERIAL Y METODOS	34
a. Colecta del material vegetal	34
b. Procedimientos químicos para la obtención de galphimina-b	34
c. Animales	37
d. Registros extracelulares en animales íntegros	37
e. Registros unitarios extra e intracelulares en neuronas del AVT en rebanadas de cerebro de rata	39
1) Registros extracelulares en neuronas del AVT.	41

2) Registros intracelulares en neuronas del AVT.	42
VII. RESULTADOS	45
a) Registros extracelulares en animales íntegros	45
b) Registros en rebanadas de cerebro de rata	49
1) Evaluación de la interacción con los sistemas GABAérgicos	49
2) Evaluación del efecto de G-B sobre el potencial de membrana en condiciones basales	57
3) Evaluación del a interacción con L-glutamato	59
VIII. DISCUSION	68
IX. REFERENCIAS	74

RELACION DE ABREVIATURAS

AMPA	ácido(RS)- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol ácido proprionico.	H ₂ O	agua
		i.p.	intraperitoneal
		i.v.	endovenoso
AVT	area ventral tegmental	K ⁺	potasio
C ₆ H ₁₄	hexano	KA	kainato
Cav	Cavaniles	KCl	cloruro de potasio
Ca ₂ ⁺	calcio	MeOH	metanol
CaCl ₂	cloruro de calcio	Me ₂ CO	acetona
CCK	colecistokinina	m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
CE ₅₀	concentración efectiva media	Mg ²⁺	magnesio
CHCl ₃	cloroformo	MgSO	sulfato de magnesio
CI ₅₀	concentración inhibitoria media	NaCl	cloruro de sodio
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona	NaH ₂ PO ₄	dihidrógeno fosfato de sodio
CO ₂	dioxido de carbono	NaHCO ₃	hidrocarbonato de sodio
EtoAc	acetato de etilo	NMDA	ácido n,metil-D-aspártico
GABA	ácido gamma-amino butírico	NT	neurotensina
Gal	galphimina-B	O ₂	oxigeno
Glut	glutamato	PPSE	potenciales postsinápticos excitadores
G-B	galphimina-B	s.c.	subcutáneo
G. glauca	Galphimia glauca	SNC	sistema nervioso central
HEPES	ácido n-[2-hidroxietil] piperazina-N-[2-etanesulfónico]	TTX	tetrodotóxina
		Zn ²⁺	zinc

RESUMEN

Infusiones de la especie vegetal *Galphimia glauca* (Familia Malpighiaceae) conocida popularmente como "calderona amarilla" son utilizadas en la medicina tradicional mexicana como un remedio "sedante y tranquilizante" para el tratamiento de algunos padecimientos del sistema nervioso central (SNC) como: psicosis, ansiedad, convulsiones, hiperexcitabilidad nerviosa e insomnio. En trabajos recientes y partiendo de un extracto metanólico de las partes aéreas de esta planta, se aisló e identificó un nuevo compuesto activo al que se denominó galphimina-B (G-B). Este compuesto, un nor-seco-triterpeno, posee efectos depresores del SNC; su administración sistémica produce sedación, hipnosis y alteraciones conductuales que sugieren una interacción con algunas estructuras del tallo cerebral, principalmente con áreas dopaminérgicas mesencefálicas. Con base en esta hipótesis, se evaluó el efecto de su administración sistémica y local sobre las propiedades eléctricas de la membrana en neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (AVT) en ratas. Se realizaron registros unitarios extracelulares en animales íntegros, así como, registros intracelulares y extracelulares en rebanadas de cerebro de rata. Los resultados mostraron que la G-B modificó, de una forma repetida y consistente, la actividad eléctrica de las neuronas en el AVT. En general la G-B inhibió la actividad de las vías dopaminérgicas mesencefálicas. Los registros intracelulares en rebanadas de cerebro mostraron que los efectos inhibidores de la G-B sobre los potenciales postsinápticos excitadores (inducidos por estimulación de campo) fueron similares a los producidos por GABA y clonazepam, pero a diferencia de cómo ocurrió con ellos, las acciones de la G-B no fueron bloqueadas por los antagonistas: bicuculina, picrotóxina o flumazenil, proponiendo así, un mecanismo de acción independiente a los receptores de GABA. La evaluación de la interacción entre G-B, dopamina y glutamato, mostró que los dos primeros compuestos inhiben la actividad espontánea de las neuronas dopaminérgicas mientras el glutamato produce efectos excitadores. La aplicación simultánea de estos compuestos mostró que la G-B inhibe en forma importante los efectos del glutamato, a diferencia de dopamina que no modificó la acción del neurotransmisor excitador. Se concluye que los efectos producidos por la G-B no se realizan a través de su interacción

directa con los sistemas GABAérgicos; que estos efectos también difieren de los ejercidos por la dopamina y que probablemente se deben a una interacción, aún no definida, con los sistemas glutamatérgicos que inervan a las neuronas dopaminérgicas del AVT.

SUMMARY

Galphimia glauca cav. from the Malpighiaceae family and commonly known as "calderona amarilla" is a widely used plant in Mexican traditional medicine as a sedative and tranquilizer. From this plant a new bioactive compound with central nervous system depressant properties was recently isolated, such compound, named galphimine-B, is a triterpenoid that also exerts sedative, hypnotic and behavioral effects that suggest an action on brain stem regions involved in the regulation of emotional arousal mechanism, mainly in dopaminergic mesolimbic structures. According to this suggestion, the effect produced by the systemic and local administration of the new triterpenoid was evaluated on the membrane electrical properties of dopamine ventral tegmental area (VTA) neurons of the rat. Extracellular recordings in whole animals and, extracellular and intracellular recordings in brain slices showed that galphimine-B modified VTA neuronal activity, denoting that this area is sensible to the action of this compound. Galphimine-B reduced the activity of dopaminergic mesencephalic pathways, while, intracellular records in brain slices showed that the effects of galphimine-B on electrically induced excitatory postsynaptic potentials were similar to that produced by GABA and clonazepam but, as it occurred with them, the actions of galphimine-B were not blocked by bicuculline, picrotoxin or flumazenil; denoting a mechanism of action different than that of GABA. The evaluation of the interaction between galphimine-B, dopamine and L-glutamate, showed that, the first two compounds inhibited the spontaneous activity of dopaminergic neurons, nevertheless, the new compound inhibited notoriously the excitatory effect produced by glutamate while, this action was not reproduced by dopamine. In conclusion, the activity of the new compound seems to be produced by its action on VTA glutamatergic pathways.

I. INTRODUCCION

La galphimina-B (G-B) es un compuesto nor-seco, triterpeno, que proviene de la especie vegetal *Galphimia glauca* Cav. (Fam. Malpighiaceae). Esta es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana para “curar los nervios y tranquilizar a los locos”; en pruebas farmacológicas sus extractos muestran efectos sedantes y depresores del sistema nervioso central, por ejemplo: en roedores, su administración reduce los efectos de algunos fármacos convulsivantes, además de potenciar las acciones de sustancias sedantes e hipnóticas; también reducen la contracción inducida por estimulación eléctrica del íleon aislado de cobayo, a través de un efecto mediado por el sistema nervioso entérico, sin embargo, se desconoce aún tanto el sitio como el mecanismo de acción empleado por estos extractos para inducir tales efectos. Conductualmente, los compuestos encontrados en estos extractos reducen en forma general la actividad motora y son particularmente depresores cuando está actividad esta dirigida hacia una meta u objetivo, lo cual sugiere un efecto sobre los sistemas motores motivacionales cerebrales.

En este sentido, desde hace varias décadas, se demostró la participación de las neuronas dopaminérgicas del tallo cerebral en los mecanismos motivacionales y de la conducta dirigida hacia una meta. Los sistemas dopaminérgicos mesolímbicos y mesocorticales son particularmente cruciales en los procesos de integración requeridos para un normal funcionamiento motivacional. Estos sistemas, los cuales se originan en el área ventral tegmental y zonas vecinas (AVT, áreas A₈, A₉ y A₁₀) proveen de una entrada dopaminérgica a estructuras importantes del sistema límbico y a la corteza frontal, además, estas estructuras son fundamentales en la coordinación y génesis de procesos cognitivos; como consecuencia, el efecto terapéutico de muchos de los fármacos antipsicóticos de uso actual, resulta de una acción directa sobre los procesos electrofisiológicos de las neuronas del AVT.

Se han descrito al menos 3 sistemas de neurotransmisores en esta región, los cuales están interrelacionados y son fundamentales para su buen funcionamiento, estos son: el dopaminérgico, el cual está formado por un contingente de fibras eferentes hacia las áreas del sistema límbico y corteza cerebral; el glutamatérgico, cuyos receptores postsinápticos tienen alta afinidad para AMPA y NMDA, que modulan los patrones de respuesta eléctrica de las neuronas dopaminérgicas; el GABAérgico, que mantiene el estado de excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas en un nivel acorde a las necesidades del individuo. A pesar de que se han descrito algunas características importantes de estos 3 sistemas, su interacción, complementación e integración con las funciones correspondientes del AVT son aún desconocidas; tanto las propiedades neuronales como conductuales de esta estructura la convierten en un blanco de los efectos del compuesto activo de la especie *Galphimia glauca*, la galphimina-B, sugerencia que es analizada experimentalmente en el presente trabajo.

Inicialmente se mostró que la administración de la G-B, ya sea en forma sistémica (*i.p.*) o local por la técnica de micropresión, induce modificaciones en la frecuencia de descarga en la mayoría de neuronas registradas en el AVT, sin embargo, estos resultados no indican el mecanismo por el cual este efecto se lleva a cabo, ni la forma en que este compuesto interactúa con los 3 sistemas de neurotransmisores descritos en el AVT. El presente trabajo describe los efectos de la G-B sobre la actividad eléctrica de las neuronas del AVT de rata, para ello, se registró la actividad unitaria celular de neuronas del AVT tanto en animales íntegros (*in situ*) como en rebanadas de cerebro; en estas últimas, se realizaron además registros intracelulares para analizar los efectos producidos tanto por G-B como aquellos desencadenados por sustancias con acciones sobre neuronas dopaminérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas.

II. ANTECEDENTES

a. ASPECTOS ETNOBOTANICOS DE *Galphimia glauca*

Galphimia glauca Cav. pertenece a la familia de las Malpighiaceas y es un arbusto siempre verde de 2 hasta 4 metros de altura que florece todo el año. Esta planta es muy ramificada en el tallo, con hojas blandas, ovales u oblongas de 5 cm de largo por 1.5 cm de ancho, con puntas agudas en el ápice y angostas o truncas en la base y bordes enteros más o menos glaucas, generalmente glabras, y de pecíolos delgados (Fig. 1). Las inflorescencias surgen en panículas, con pedicelos anchos, de pocas flores, raquis pubescente, con pelos rojo oscuros y glabros con el tiempo; sus sépalos son oblongos o lanceolados de 3.5 mm de largo, con corola amarilla y pétalos de 12 mm de largo; su fruto es una cápsula de 4 mm de largo de caras color rojo escarlata, con rugosidades (1). Es una especie nativa de México que crece principalmente en los estados de Guerrero, Michoacán, San Luis Potosí, Morelos, Chiapas y Sonora (2). En términos generales la planta se distribuye en altitudes de 0 a 2350 m.s.n.m. y crece en forma silvestre en pastizales, matorrales y bosques, de preferencia en lugares de vegetación perturbada (3). Se describe a *Thryallis glauca* como sinónimo científico del género botánico *Galphimia glauca*(4).

En México, *Galphimia glauca* Cav. es conocida popularmente bajo diferentes nombres, en el estado de Guerrero recibe el nombre de "*Corpionchi*"; en Michoacán se le conoce como "*Huachacata*", "*Nacachata*", "*Vacachata*", "*Calderona*" o "*Flor de Diciembre*"; en Jalisco la llaman "*Ramo de Oro*"; en San Luis Potosí, "*Hierba del piojo*"; en Guanajuato, "*Hierba del Cuervo*"; en Morelos, "*Xaxaxaoti*" y en Chiapas, "*Flor de Chinche*" (2).

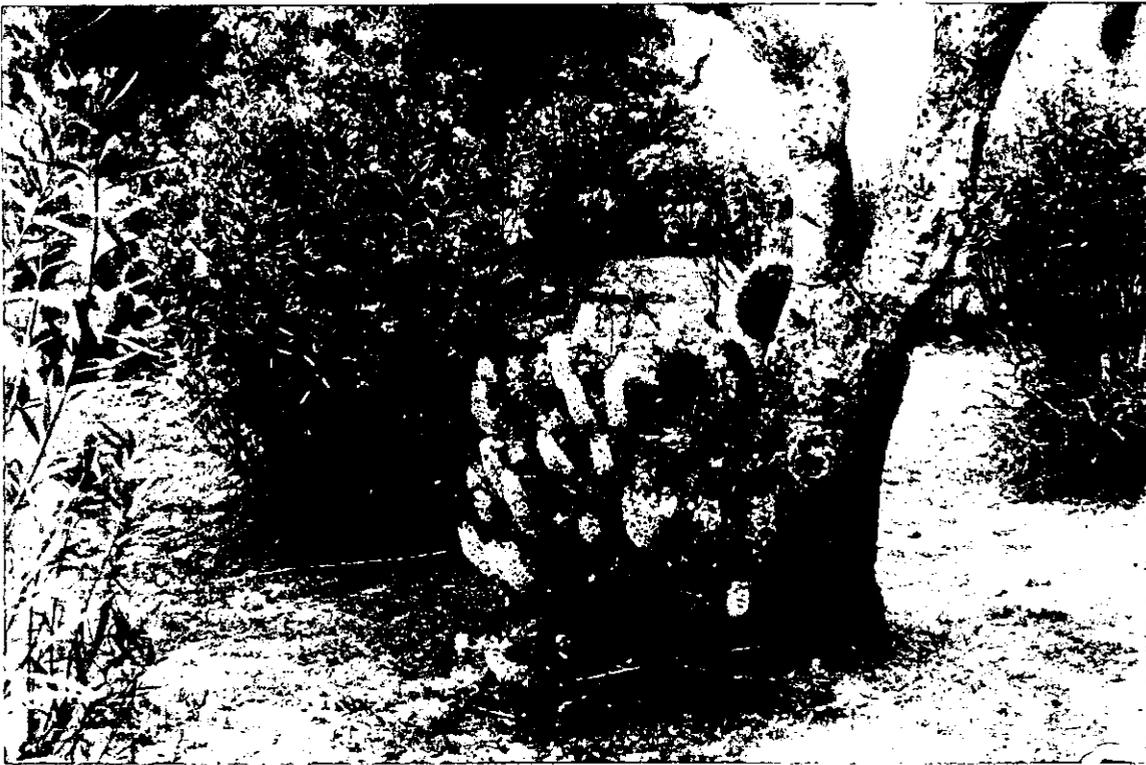


FIG 1.

Fotografía de una planta de Galphimia glauca creciendo en forma silvestre en el sitio de colecta en el estado de Guanajuato.

La voz Nahuatl que se utiliza para denominar a esta planta “**Totoncapatli**” proviene de **TOTONQUI=CALIENTE** y **PATLI=MEDICINA**, lo que sugiere que en tiempos precolombinos se consideraba como recurso medicinal y que el nombre podría aludir a su posible utilización para combatir la fiebre.

Francisco Hernández (1576) incluye a *G. glauca* en su tratado “**Historia de las Plantas de la Nueva España**”, el cual contiene información de finales del siglo XVI, señalando que esta planta “**Cura, untada al cuerpo, los fríos de las fiebres intermitentes y fortalece a las parturientas; contiene las diarreas; quita el empacho y cura las disenterías**”. Ninguna

otra fuente histórica sobre la herbolaria mexicana del siglo XVI la vuelve a mencionar, por lo que ignoramos el uso que haya tenido en épocas anteriores a la llegada de los españoles.

En los siglos posteriores, los usos terapéuticos de *G. glauca* encontrados en la literatura, vuelven a referirse a su utilidad para combatir la fiebre en infecciones como la disentería. Fray Juan Navarro (1803) la cita en su obra sobre plantas medicinales "*Flora Medicinal o Jardín Americano*" escrita hacia el final del siglo XVIII, señalando que "*sus hojas son calientes, secas y astringentes; arimadas al cuerpo curan los fríos de las calenturas; en ayunas cura la disentería*". Como lo hicieron otros autores, la obra de Navarro buscó traducir al español la información de Hernández, originalmente escrita en latín en el siglo XVI, por lo que resulta comprensible que el uso que se reporta en las obras médicas novohispanas es el mismo reportado por el Protomédico. Según Maximino Martínez, quien reunió la información sobre herbolaria medicinal mexicana de finales del siglo XIX, el cocimiento de las hojas de *Galphimia* se usaba en ese tiempo como emoliente y para curar heridas. El mismo autor señala que en el estado de Morelos se preparaba un cocimiento con esta planta al que añadían "*sanguinaria*" (*Hypericum pratense*) y otras dos especies más, aún no identificadas, llamadas "*ihillacatzihuitl*" y "*huitlatexihuitl*" y que el cocimiento era utilizado por las embarazadas que padecían de "flores blancas"(2). En general, es escasa la información científica experimental disponible de esta especie botánica en particular; aparece incluida en una publicación de 1965, en la cual se reportaron los resultados de un cernimiento químico y farmacológico realizado en más de 100 especies vegetales; mediante pruebas de coloración se identificaron diferentes grupos fitoquímicos como alcaloides y fenoles y se efectuaron pruebas toxicológicas de dosis letal media y algunos estudios biológicos antimicrobianos y antitumorales. La planta en cuestión no presentó una actividad que permitiera resultados concluyentes (5). En el año de 1959 se reportó también la presencia de ácido gentísico en esta planta (6).

Aunque se carece de registros escritos actuales, se sabe que desde hace tiempo *Galphimia glauca* es utilizada en la medicina tradicional mexicana como un sedante y tranquilizante en algunos enfermos mentales. Tal empleo genera situaciones comprometedoras; como sucede en el estado de Guanajuato donde, la gente suele coleccionar la planta al amanecer, fuera del alcance de miradas curiosas, para evitar ser sorprendida y que la comunidad suponga que en la familia del colector "existe algún loco que necesite ser calmado". Las propiedades tranquilizantes de esta planta fueron utilizadas también durante la Guerra Cristera (1926 - 1929) en México, aquellos soldados que mostraban diarreas profusas, una gran palidez y temor antes de entrar en batalla, recibían una infusión preparada con las hojas y tallos de esta planta, con lo que se sentían más tranquilos y las diarreas nerviosas desaparecían (comunicación personal Prof. Erick Estrada Lugo, UACH). De la aplicación médica tradicional de *Galphimia glauca* Cav. como sedante, solo se encuentra un reporte escrito donde se señala que esta planta se utiliza como "sedante nervioso" (7).

b. ASPECTOS FARMACOLOGICOS DE LOS EXTRACTOS DE Galphimia glauca

Los antecedentes arriba mencionados sugieren que los extractos provenientes de esta planta son capaces de generar efectos depresores selectivos sobre el sistema nervioso central. En un trabajo previo, se observó que la administración intraperitoneal de un extracto íntegro metanólico de las partes aéreas de esta especie potenció significativamente el efecto hipnótico del pentobarbital sódico (45 mg/kg) (8). Por otro lado, estos mismos extractos redujeron los efectos de fármacos estimulantes, como el nitrato de estriquina y el pentilentetrazol, por lo que su administración incrementó en la rata, el tiempo de aparición (latencia) de convulsiones tónicas inducidas por estriquina (1.5 mg/kg, i.p.) y prolongó el tiempo de latencia tanto de convulsiones tónicas como clónicas en ratones tratados con pentilentetrazol por vía subcutánea (110 mg/kg) (Tabla 1 y Fig. 2); en este caso los extractos también

disminuyeron tanto el número de animales que presentaron convulsiones como el de aquellos que fallecieron en la prueba (8).

Tabla 1

Efecto producido por la preadministración intraperitoneal del extracto metanólico de *Galphimia glauca* sobre las convulsiones inducidas con pentilentetrazol (110 mg/kg, s.c.) en ratón

Grupo	Latencia Convulsión Clónica (min)	Latencia Convulsión Tónica (min)	Convulsiones %	Mortalidad %
Vehículo	1.5 ± 0.8	5.3 ± 0.6	100	100
Extracto 50 mg/kg i.p.	1.9 ± 0.9	9.5 ± 3.2 * (p<0.1)	70	60

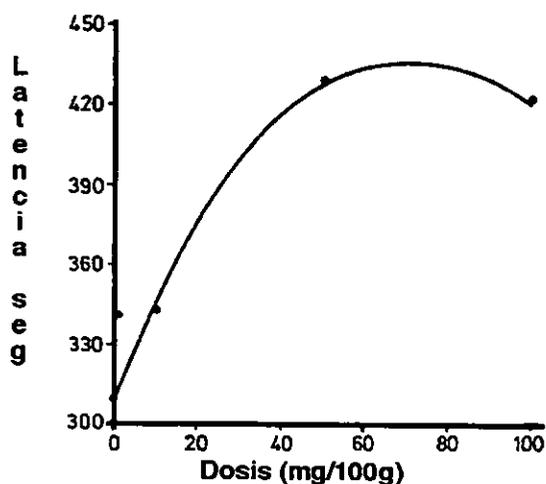


FIG 2.

*Gráfica que muestra el efecto producido por la preadministración (30 minutos) intraperitoneal de diferentes dosis del extracto metanólico de *Galphimia glauca* sobre el tiempo de aparición de las convulsiones inducidas con estricnina (1.5 mg/kg, i.p.).*

Otra acción depresora de estos extractos se observó sobre la temperatura corporal de los animales; su administración intraperitoneal (50 mg/kg) a ratas normotérmicas disminuyó en forma altamente significativa ($p<0.001$) la temperatura corporal, aunque se desconoce si este efecto es

debido a una acción periférica o es resultado de un efecto a nivel de los centros cerebrales reguladores de la temperatura corporal (8). Por otra parte, en estudios *in vitro*, se mostró que estos compuestos deprimen también a los grupos neuronales en el tubo digestivo así, en la preparación de íleon aislado de cobayo *in vitro*, en el cual la estimulación eléctrica de campo induce una contracción neurogénica de la musculatura lisa, debido a un efecto mediado a través de los nervios entéricos, la aplicación del extracto produjo inhibición, dependiente de la concentración, de la contracción muscular inducida por estímulo de campo eléctrico (8) (Fig. 3).

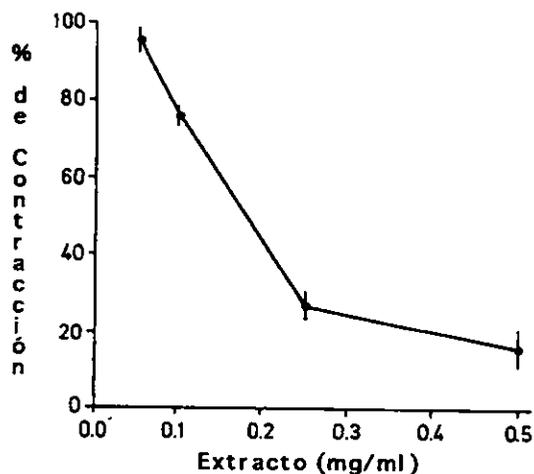


Fig. 3

Gráfica que muestra la inhibición producida por el extracto metanólico de Galphimia glauca sobre las contracciones musculares inducidas en la preparación in vitro de íleon aislado de cobayo.

c. ANTECEDENTES DEL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE GALPHIMINA-B

En un intento por identificar el compuesto que provoca estos efectos depresores de la actividad neuronal y partiendo del mismo extracto activo antes mencionado, se realizó una separación química orientada hacia el aislamiento de compuestos activos; para ello, se utilizaron diferentes técnicas

muy conocidas en fitoquímica y dos modelos farmacológicos, el modelo *in vitro* del ileon aislado de cobayo y el modelo *in vivo* de potenciación del efecto hipnótico de barbitúricos.

Originalmente, se realizó una partición en disolventes en la que se seleccionó la fracción orgánica. Esta fracción orgánica más tarde se hizo pasar a través de sistemas de separación cromatográfica basados en columnas gravitacionales, empacadas ya sea con gel de sílice, óxido de aluminio ó con carbón activado. Finalmente y gracias a la cromatografía de líquidos de alta resolución y a los procedimientos de cristalización se purificó y obtuvo un principio activo. El compuesto aislado fue analizado por el Dr. Alfredo Ortega Hernández y colaboradores (Instituto de Química de la UNAM), mediante diferentes técnicas de espectrometría, resonancia magnética nuclear, infrarojo, carbono 13 y difracción en rayos X, llegando a la elucidación estructural de un nuevo compuesto tipo nor, seco-triterpeno al que se le dió el nombre de galphimina-B (Fig. 4), siendo su nombre químico 13α -Carbometoxi- $4R$ - 7α , 18β -tri-hidroxi-30-nor-3,4seco-fridela-1,20-dien-3,24-olide. $C_{30}H_{44}O_7$ (9). En el proceso de separación se logró identificar otro compuesto, el cual presenta el mismo núcleo estructural y cuya única diferencia con el compuesto galphimina-B es la presencia de un grupo acetato incluido en el carbono cuatro; a esta molécula se le denominó galphimina-A. El segundo compuesto se encontró en menor cantidad, por lo que, siendo galphimina-B el compuesto activo mayoritario fue seleccionado para su evaluación experimental.

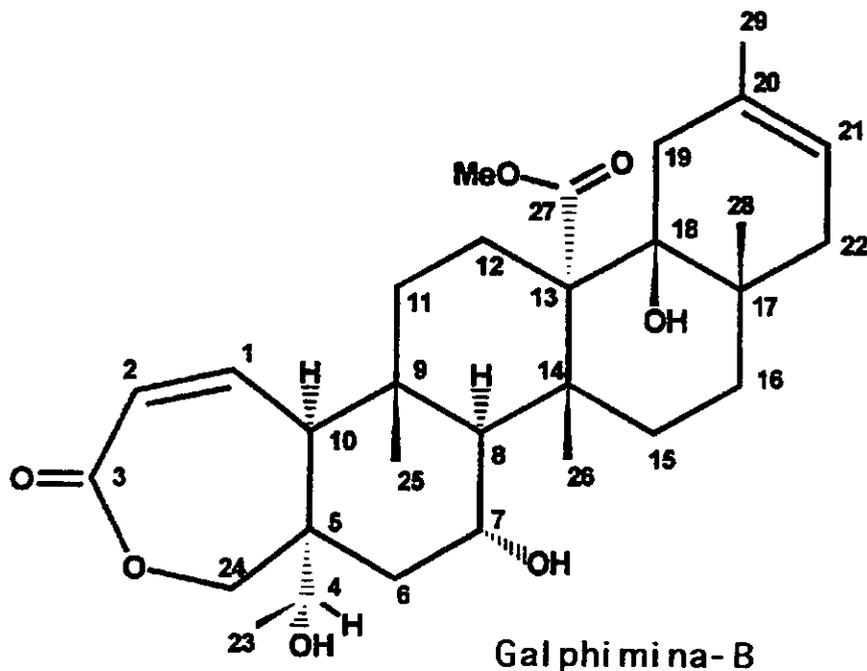


FIG. 4.

Representación esquemática de la estructura química de la galphimina-B, el principio activo aislado de los extractos metanólicos de Galphimia glauca. Se trata de un compuesto nor,seco-triterpeno.

d. ASPECTOS FARMACOLOGICOS DEL COMPUESTO GALPHIMINA-B.

Una vez que este compuesto fue aislado e identificado como galphimina-B, se procedió a evaluarlo en diferentes modelos farmacológicos. Los resultados de los cuales mostraron que su acción depresora no se manifiesta en procesos motores generalizados, por ejemplo, efectos protectores a la inducción de convulsiones en ratones por la administración intraperitoneal o subcutánea de estricnina o pentilenetratrazol, en cambio, se observaron efectos depresores de actividades motoras encaminadas a un objetivo o una meta, como lo que ocurre con la actividad estereotipada o de localización y adaptación en ambientes novedosos, o en conductas específicas como la inducción de hipnosis en ratones (10). Estos datos apoyan la idea de una acción depresora específica sobre el sistema nervioso central, particularmente sobre aquellas regiones que regulan las conductas motivacionales y que están implicadas en los procesos de castigo y recompensa con un fuerte componente motor. En lo que respecta a su efecto

hipnótico, la G-B, evaluada en el modelo de potenciación de la hipnosis inducida por un barbitúrico, incrementó en forma significativa el efecto hipnótico del pentobarbital sódico, con un comportamiento dependiente de la dosis (Fig. 5).

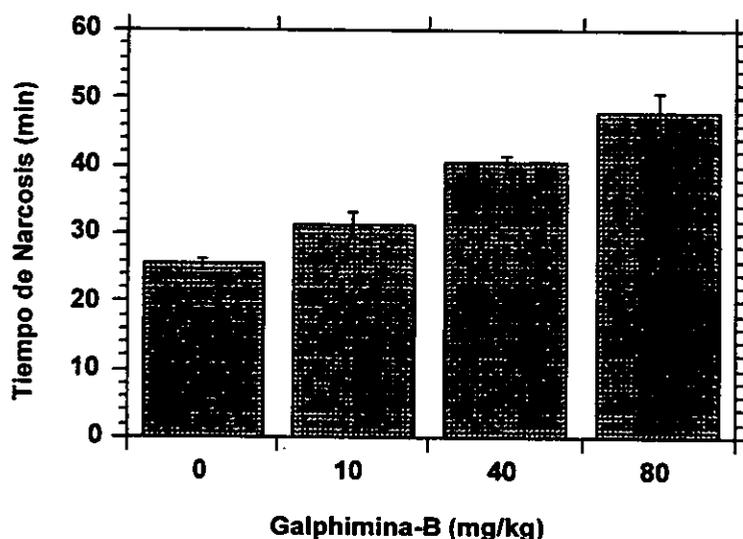


FIG. 5.

Gráfica que muestra el efecto producido por la administración de pentobarbital sódico (45 mg/kg i.p.) en ratones pretratados (30 minutos) con diferentes dosis de la galphimina-B por vía intraperitoneal.

La G-B también ejerce efectos depresores de la respuesta neurogénica en el intestino. En la preparación de íleon aislado de cobayo este compuesto induce una potente inhibición de la contracción inducida por un estímulo eléctrico de campo, el cual actúa sobre los grupos neuronales entéricos para liberar acetilcolina, que en su momento provocará una estimulación directa sobre la musculatura lisa para su contracción. La G-B mostró una concentración efectiva media (CE_{50}) de 50 $\mu\text{g/ml}$ (10).

e. PARTICIPACION DE LAS NEURONAS DEL AREA VENTRAL TEGMENTAL EN LOS PROCESOS MENTALES COGNOSCITIVOS

Los efectos depresores mostrados por la G-B sugieren una acción mediada a través de los sistemas neurales involucrados en los procesos motivacionales. La organización de la conducta motora dirigida hacia un objetivo o meta depende de la articulación de varios centros y regiones cerebrales (11). Tal actividad dirigida obedece a un impulso o motivación, entendiendo a ésta como un proceso mediante el cual los organismos realizan una conducta para el control del medio ambiente en relación a sus necesidades (12). El denominador común de todos los centros que participan en la integración de este sistema es su interconexión a través de neuronas dopaminérgicas. El sustrato neuroquímico responsable de los procesos motivacionales, los cuales incluyen los procesos de premio y castigo, de reforzamiento de la conducta por efecto de drogas o procesos cognoscitivos, se basa en la activación de vías neurales prosencefálicas específicas cuyo neurotransmisor es la dopamina (13,14).

Las neuronas dopaminérgicas que proyectan al prosencéfalo se originan de tres grupos celulares que son denominados A₈, A₉ y A₁₀ de acuerdo con su localización topográfica (15). El grupo A₉ corresponde a las células localizadas en la parte compacta de la sustancia nigra, mientras que el grupo A₁₀ está conformado por cuerpos celulares de las neuronas del área ventral tegmental (AVT) y la zona A₈ está constituida por células que se localizan en la región retrorubral mesencefálica (Fig. 6).

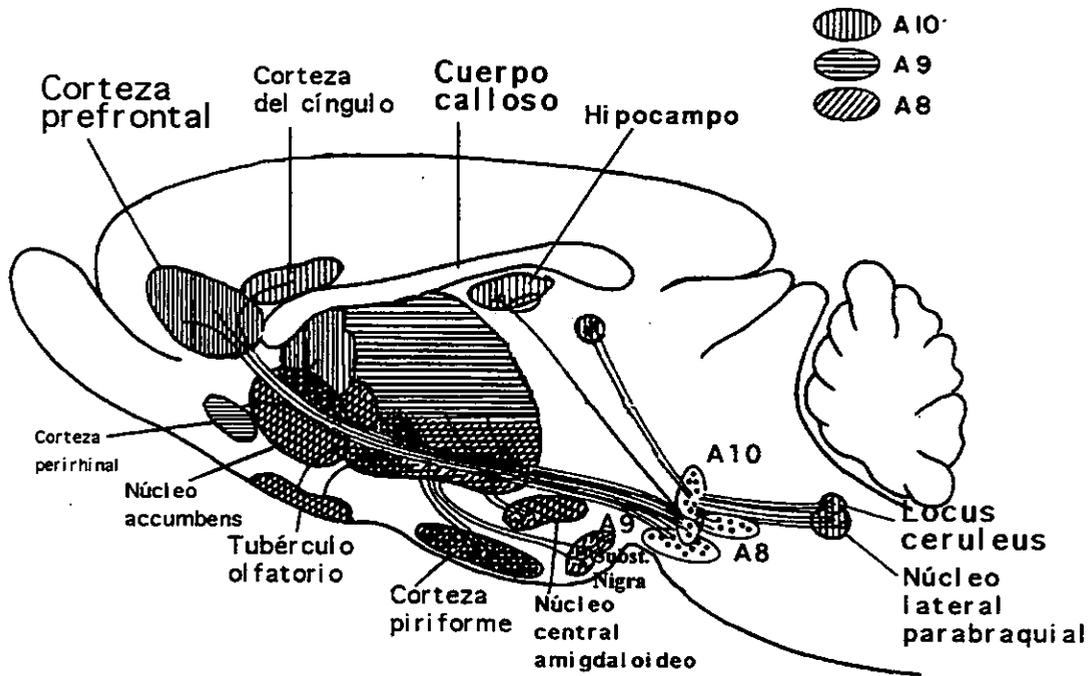


FIG. 6.

Esquema que muestra un corte sagital de cerebro de ratona donde se aprecian las zonas A₈, A₉ y A₁₀, según la clasificación elaborada por Dahlström y Fuxe en 1965 (16). En la clasificación los grupos neuronales monoaminérgicos del tallo cerebral se encuentran clasificados de acuerdo con la localización de sus cuerpos celulares. Los patrones con rayas muestran las áreas a las que se emiten proyecciones axonales.

Los sistemas dopaminérgicos prosencefálicos se han clasificado con base en la naturaleza de la región que inervan. Una clasificación inicial describió un sistema nigro-estriatal, el cual se dirige de las neuronas del grupo A₉ hacia el caudado-putamen y un sistema mesolímbico el cual se origina de la región A₁₀ y la porción medial de A₉, y proyecta hacia el núcleo accumbens, tuberculum olfatorio y áreas límbicas, como el septum, la amígdala, el núcleo del lecho de la estria terminalis y el hipocampo, región muy importante para los procesos de memoria y aprendizaje (17). Más adelante, a estos dos sistemas se agregó un sistema mesocortical el cual, proyecta de las zonas A₉ y A₁₀ hacia la corteza prefrontal y las cortezas entorhinal, piriforme y cingulada

anterior (18) (Fig 7). La corteza prefrontal es una porción de los hemisferios cerebrales implicada en procesos de razonamiento, integración sensorial y que aporta los valores éticos y morales a la conducta de los individuos (19).

Existen otros sistemas dopaminérgicos cuyo origen y proyecciones se localizan en otras regiones. Ejemplos de estos son los sistemas dopaminérgicos tuberoinfundibulares, los cuales proyectan de los núcleos arqueado y periventricular hacia el lóbulo intermedio de la hipófisis y la eminencia media, la región dorsal del nervio vago, el núcleo del tracto solitario y las células diseminadas en la radiación tegmental de la materia gris periacueductal. Este sistema dopaminérgico ejerce una modulación muy importante sobre la liberación de varias hormonas; de hecho, se considera a la dopamina como el factor inhibidor de la liberación de prolactina.

Existen también los sistemas dopaminérgicos periglomerulares del bulbo olfatorio y el sistema interplexiforme de la retina de los vertebrados. Ambos sistemas modulan la excitabilidad de las respectivas estructuras.

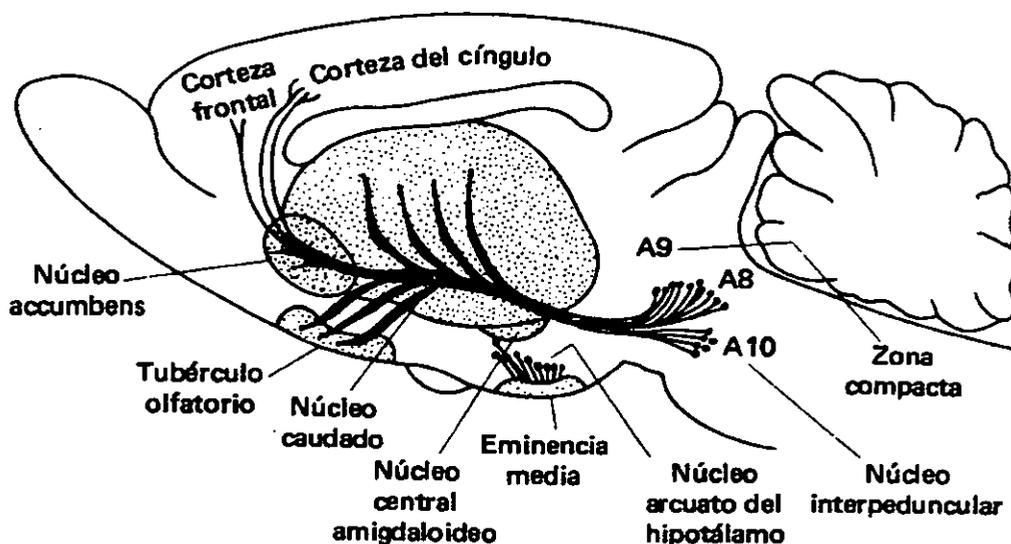


FIG. 7.

Esquema que representa un corte sagital de cerebro de rata en el que se muestran los sistemas dopaminérgicos del tallo cerebral, organizados en tres sistemas de proyecciones principales: el nigroestriatal, el mesolímbico y el mesocortical.

Las aferencias que reciben las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas pueden dividirse en intrínsecas y extrínsecas. Las intrínsecas derivan de las mismas neuronas dopaminérgicas que liberan dopamina de sus dendritas (20); esta dopamina actúa en los receptores somatodendríticos de tipo D_2 de la sustancia nigra y/o del AVT para modular su excitabilidad (21). Es posible que además tanto la neurotensina (NT) como la colecistokina (CCK), las cuales son coliberadas en conjunto con la dopamina en las dendritas de las neuronas dopaminérgicas, regulen también la función de las neuronas dopaminérgicas (22). Las neuronas dopaminérgicas de estas regiones también están sometidas a la acción de una aferencia inhibitoria tónica ejercida por neuronas GABAérgicas de la parte reticulata de la sustancia nigra y del VTA (23).

Las aferencias extrínsecas de esta región son de amplia distribución; se encuentran entre ellas las aferencias estriatales ventrales, las cuales se dirigen a las neuronas del área A_9 , a través de un conocido sistema de retroinformación (24); además, las porciones externas del núcleo accumbens proyectan principalmente a las neuronas del área A_{10} , mientras que la región media de este núcleo lo hace a la porción medial del área A_9 (25). Las proyecciones del estriado se originan en neuronas espinosas de tamaño medio que liberan GABA y neurokinina en sus respectivas terminales dentro del AVT y la sustancia nigra. Estos neurotransmisores actúan en receptores $GABA_A$ localizados en neuronas no dopaminérgicas del AVT y en receptores $GABA_B$ y NK_2 encontrados en neuronas dopaminérgicas tanto del AVT como de la sustancia nigra (19).

Las aferencias extrínsecas excitadoras de tipo glutamatérgico provienen de la corteza prefrontal y terminan en neuronas de las regiones A_9 y A_{10} . En estas neuronas se encuentran receptores glutamatérgicos ionotrópicos de tipo AMPA y NMDA. Se supone que estos receptores median un tipo de descarga en ráfagas, característico de estas neuronas, el cual es inducido por impulsos generados en la corteza prefrontal (26). Adicionalmente, las neuronas

dopaminérgicas de las regiones A₉ y A₁₀ también reciben una proyección colinérgica que se origina en el núcleo pedunculopontino (27). Estas proyecciones excitan a las neuronas dopaminérgicas a través de receptores colinérgico nicotínicos. Otras aferencias son las provenientes de los núcleos subtalámicos, el globo pálido dorsal y ventral, los cuales contribuyen con vías tanto excitadoras (glutamatérgicas) como inhibitoras (GABAérgicas) hacia ambas zonas. Además, los núcleos del rafé emiten proyecciones serotoninérgicas y el locus ceruleus, noradrenérgicas a las neuronas del AVT. Tales proyecciones son el sustrato anatómico de las interacciones serotonina-dopamina y noradrenalina-dopamina, las cuales son involucradas frecuentemente en los estudios conductuales y psicoterapéuticos (28).

Otras proyecciones hacia las neuronas dopaminérgicas del AVT se originan en un gran número de núcleos que son parte del sistema límbico como son la amígdala, los núcleos pre y supraópticos hipotalámicos y la habénula lateral, pero, la información acerca de los neurotransmisores que utilizan estas vías, su distribución y topografía dentro del núcleo, así como su mecanismo de acción y su función es muy limitada (29).

La acción de la dopamina, mediada por auto-receptores localizados en las neuronas del AVT es básicamente modulador, es decir, su interacción con estos autoreceptores no estimula o inhibe la generación de potenciales de acción por una acción directa sobre algún canal iónico, con lo cual podría depolarizar o hiperpolarizar a la membrana celular; en lugar de ello, estos receptores alteran la respuesta de la membrana celular a los neurotransmisores rápidos (glutamato y GABA) por modificar la dependencia de voltaje de los canales iónicos dependientes del voltaje (30). Esta acción, aunque indirecta, sugiere que la liberación de este neuromodulador es crítica para la acción de otros neurotransmisores. La liberación de dopamina en la terminal nerviosa es dependiente de Ca²⁺ y su duración depende de la frecuencia y patron de descarga. Las descargas en ráfagas permiten una mayor liberación de dopamina y lo más importante es que esta liberación se

encuentra modulada por autoreceptores (D_2), sistema por el cual la dopamina y sus agonistas inhiben la actividad celular y la liberación de dopamina.

En contraste, los efectos postsinápticos de la dopamina parecen ser consecuencia de una modificación en la sensibilidad de los canales de K^+ de una manera dependiente del voltaje (31). Algunos efectos de la dopamina también son presinápticos, esto es, actuando a través de receptores presinápticos del tipo D_2 ; esta catecolamina es capaz de modular la eficiencia de acoplamiento entre la excitación y la secreción. Entonces a través de estos auto-receptores, la dopamina inhibe su propia liberación, mientras que a través de hetero-receptores presinápticos modula la liberación de otros neurotransmisores, incluyendo al glutamato y al GABA (32).

En particular, el papel de los sistemas dopaminérgicos, mesolímbicos y mesocorticales parece ser crucial en los procesos de integración requeridos para un normal funcionamiento cognoscitivo. Este papel del AVT se pone de manifiesto en los estudios sobre terapéutica de algunos procesos psiquiátricos, como por ejemplo, el beneficio farmacológico de las sustancias antipsicóticas se relaciona con una acción a nivel de esta zona del tallo cerebral (14), también la manipulación de las neuronas dopaminérgicas que proyectan a estructuras como el núcleo accumbens, es decir el sistema mesolímbico, modifica sustancialmente algunos tipos de conductas motoras propositivas, las cuales se presentan en algunos de los padecimientos psiquiátricos, como es el caso de las estereotipias (21) y las catatonias (22). Además tanto la dinámica, como el tipo de respuesta farmacológica que los pacientes muestran hacia estas sustancias, siguen un patrón muy similar a los efectos electrofisiológicos que producen en esta región. Múltiples resultados experimentales muestran que los fármacos que inducen dependencia física y/o psicológica, los cuales se relacionan directamente con los procesos de reforzamiento positivo (como es el caso de la cocaína, morfina, amfetamina y el etanol, entre otros), inducen efectos significativos en esta estructura (15,16,17,18). Se ha mostrado que la mayor parte de los fármacos de abuso incrementan, por

diferentes mecanismos, la transmisión dopaminérgica central y particularmente la del núcleo accumbens (40). Los fármacos de abuso pertenecen a diferentes clases farmacológicas y comparten en común la propiedad de estimular la actividad motora de una forma dopamina-dependiente y en dosis que son el umbral para incrementar la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (41). Finalmente, los cuadros de abstinencia de la mayor parte de los fármacos de abuso se asocian invariablemente con una disminución de las concentraciones basales extracelulares de dopamina en el núcleo accumbens (42). Estos resultados ponen en relieve la importancia de los sistemas mesolímbicos, AVT y núcleo accumbens, en las conductas motivacionales de la ingesta de fármacos de abuso.

Desde el punto de vista electrofisiológico, las neuronas del AVT muestran dos patrones de actividad muy característicos, existen células, muy probablemente de índole dopaminérgica que muestran descargas en ráfagas, las cuales en momentos alternan con descargas simples. Las espigas de estas neuronas muestran frecuencias de descarga de entre 2 y 8 espigas por segundo. Este tipo de neuronas constituye aproximadamente el 38 % de las células encontradas en esta región (22), el porcentaje de neuronas restante (62%) muestran descargas únicas con frecuencias mayores a 4 espigas por minuto y probablemente se trate de células no dopaminérgicas (68).

Las neuronas dopaminérgicas responden con una serie de cambios electrofisiológicos muy variables a la aplicación de agentes antipsicóticos del tipo de la clorpromazina o del haloperidol (43), así como a los fármacos inductores de dependencia y tolerancia farmacológica (44). Tal variabilidad depende básicamente de la cronicidad del tratamiento y del estado funcional del sistema, la administración de haloperidol convierte la descarga en ráfagas de estas neuronas en una descarga única, con cambios muy leves sobre la frecuencia de descarga; este efecto, el cual es muy considerable cuando se aplica el haloperidol por primera vez, se reduce notablemente cuando la administración se torna crónica (45), de hecho, estudios realizados en

animales implantados crónicamente y en los cuales es posible efectuar registro de actividad unitaria en animales despiertos, muestran que aproximadamente a los 15 días de tratamiento con haloperidol, la respuesta del AVT a este fármaco es opuesta a la encontrada en la aplicación aguda del mismo (43), esto es, la aplicación crónica provoca una disminución significativa de la frecuencia de descarga de estas neuronas, mientras la administración aguda produce un bloqueo de la descarga en ráfagas. Este efecto electrofisiológico se asocia de manera temporal con el efecto terapéutico conductual de este fármaco (46).

La descripción de los efectos terapéuticos de los antipsicóticos se basa en el conocimiento de la actividad de los distintos subtipos de receptores dopaminérgicos. La activación de los receptores D_2 , provoca efectos que dependen de su localización, entonces, la estimulación de los auto-receptores D_2 del soma o dendritas, produce una disminución de la frecuencia de descarga, mientras que la activación de los que se localizan en las terminales nerviosas, inhibe la síntesis y liberación de dopamina. Los auto-receptores presentan diferente sensibilidad que los receptores postsinápticos, así los D_2 son hasta 10 veces mas sensibles a la dopamina y apomorfina, de tal manera que una dosificación baja de un agonista tendrá un efecto preponderante sobre el autoreceptor disminuyendo la actividad dopaminérgica, mientras que una dosis mayor, estimulará además al receptor postsináptico incrementando con ello la función dopaminérgica.

Posiblemente ningún otro sistema monoaminérgico ha recibido tanta atención como el dopaminérgico; esto se debe a su implicación clínica, principalmente en la enfermedad de Parkinson (proceso neurodegenerativo progresivo que provoca una deficiencia de dopamina en el sistema nigroestriado), y en su relación con la esquizofrenia (considerada como una desorganización crónica de la función mental, la cual afecta el pensamiento, los sentimientos y los movimientos), en esta última, los fármacos antipsicóticos

(fenotiazidas, tioxantenos y butirofenonas) actúan disminuyendo la transmisión dopaminérgica, sugiriendo con ello que la esquizofrenia es consecuencia de un relativo exceso de la actividad dopaminérgica principalmente en el sistema mesolímbico.

Debido a que los pacientes que reciben fármacos antipsicóticos requieren de varias semanas de tratamiento para mostrar un efecto terapéutico, lo cual no parece tener relación con el porcentaje de ocupación de los receptores dopaminérgicos, cada vez se ha hecho más evidente que los fármacos antipsicóticos alcanzan su efecto por mecanismos más complejos, los cuales involucran algo más que un simple bloqueo de receptor (47). Es posible que en la génesis de estos padecimientos intervenga una desorganización del balance entre los varios neurotransmisores encontrados en esta región, por ejemplo, el GABA como neurotransmisor ha sido implicado también en una amplia gama de desórdenes neurológicos y psiquiátricos como la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, epilepsia, esquizofrenia, diskinesias, demencia senil y otros trastornos del comportamiento.

Los receptores GABAérgicos se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC, incluso son expresados en otras células como los astrocitos y en neuronas del sistema nervioso autónomo. Con bases farmacológicas se han descrito dos tipos principales de receptores GABA_A y GABA_B. El GABA_A es el más abundante en el SNC y el mejor estudiado, posee un canal de cloro, cuyo potencial de equilibrio se encuentra por debajo del potencial de reposo de la membrana en la mayoría de las neuronas, por lo que el aumento de permeabilidad a este ion hiperpolariza a la célula con lo que disminuye los efectos depolarizantes de un estímulo excitatorio, deprimiendo su excitabilidad. Este receptor GABA_A consiste de un canal formado por múltiples subunidades receptoras que puede ser alostéricamente modulado, entre otros, por dos importantes clases de drogas: las benzodiazepinas y los barbitúricos. La

composición de subunidades en el receptor puede variar en diferentes regiones del SNC y aún en diferentes neuronas de una misma región.

A diferencia de los receptores GABA_A, el receptor GABA_B está acoplado a canales de K⁺ y su activación ejerce un efecto inhibitorio mediado por un incremento en la conductancia de un canal rectificador entrante de potasio. La diferencia farmacológica más importante de este receptor es su afinidad selectiva por el agonista baclofen y su poca afinidad por el muscimol y la bicuculina; además de no ser modulado por benzodiazepinas o barbitúricos. La activación de este receptor atenúa la liberación de aminas, aminoácidos excitadores, neuropéptidos y hormonas. El otro neurotransmisor abundante dentro del AVT y cuya acción excitadora parece fundamental en la génesis de las descargas en ráfagas es el glutamato. El L-glutamato es un neurotransmisor excitador primario localizado a todo lo largo del sistema nervioso central y cuyas acciones son mediadas a través de receptores de tipo ionotrópico y metabotrópico (48). En el caso de las neuronas dopaminérgicas de la región de AVT, los efectos de este neurotransmisor son debidas a su interacción con 3 tipos de receptores glutamatérgicos: NMDA (ácido, n-metil-D-aspartico), KA (kainato) y AMPA (ácido amino, hidroxil, metil-ioxizol proprionico), los cuales muestran una potencia relativa de AMPA > KA > NMDA (49). Las propiedades de los receptores NMDA, los más abundantes en esta región mesencefálica incluyen una acción agonista por parte del N-metil-D-aspartato, el requerimiento de glicina como co-agonista, el bloqueo de un canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje por Mg²⁺, el antagonismo competitivo y específico por ω-fosfonatos, la inhibición por Zn²⁺ y la potenciación por poliaminas. Los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA han sido objeto de múltiples estudios, básicamente por resultados experimentales que sugieren su participación en un amplio rango de procesos fisiológicos y patológicos tan importantes y diversos como la consolidación de la memoria, el desarrollo de plasticidad, la epilepsia y los efectos neurotóxicos de la isquemia cerebral (50).

La principal fuente de glutamato al AVT la constituye las fibras de proyección corticofugales que se originan en la corteza prefrontal medial, estas fibras poseen apreciables concentraciones tanto de ácido glutámico como de ácido aspártico (51). Estudios de lesión excitotóxica mostraron una proyección aspartérgica de la corteza prefrontal medial hacia el AVT (52). Varios estudios electrofisiológicos muestran la existencia funcional de receptores a los aminoácidos excitadores en estas neuronas dopaminérgicas (53), con lo cual se sugiere que el glutamato juega un papel esencial en la regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas mesocorticales (54) y por lo tanto puede participar además en las alteraciones psiquiátricas del tipo de la esquizofrenia (55). En este sentido, la activación de los sistemas glutamatérgicos se relaciona con un incremento en la actividad dopaminérgica y la génesis de la actividad en ráfaga de estas neuronas (45), por lo que cualquier fármaco que reduzca en forma específica tal hiperactividad podría ejercer una acción sobre las terminales corticales de estas neuronas y reducir la sintomatología del padecimiento.

A pesar de que se han descrito ampliamente diferentes características muy importantes de estos 3 sistemas de comunicación en la región del AVT: el dopaminérgico, el GABAérgico y el glutamatérgico, su interacción, complementación e integración con las funciones correspondientes del área ventral tegmental, son aún desconocidas.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Resultados experimentales muestran que la administración de G-B, además de producir efectos depresores del SNC, es capaz de modificar la respuesta electrofisiológica de las neuronas del AVT de la rata (56). Tanto su administración sistémica (*i.p.* o *i.v.*) como local (por micropresión) induce modificaciones en la frecuencia de descarga de la mayoría de neuronas

registradas, efectos que no fueron observados cuando los registros se realizaron en estructuras cerebrales diferentes al AVT. Estos resultados no permiten determinar, ni el mecanismo por el cual este efecto se lleva a cabo, ni la forma en que este compuesto interactúa con los 3 sistemas más importantes de neurotransmisores que han sido descritos en el AVT. Existe la posibilidad de que los efectos inducidos por la G-B sean directos sobre las neuronas dopaminérgicas o, sean consecuencia de un efecto sobre algunos de los sistemas de neurotransmisores ahí presentes. Una acción de tipo GABAérgico, pero también una acción antiglutamatérgica o antidopaminérgica podría sustentar las modificaciones conductuales que este compuesto induce. Una forma de discernir tales posibilidades consiste en realizar un estudio comparativo entre los efectos provocados por esta sustancia con aquellos desencadenados por fármacos, cuyo mecanismo de acción ya ha sido descrito, y que ejercen efectos sobre los sistemas de neurotransmisores del AVT, como es el caso de sustancias que interactúan con los sistemas GABAérgicos y los que emplean glutamato como neurotransmisor. El poseer esta información nos permitiría establecer un posible mecanismo de acción de este compuesto, así como sugerir su perfil farmacológico y terapéutico, además de brindarnos información relacionada con la organización sináptica de esta importante área cerebral.

IV. HIPOTESIS

Si los efectos electrofisiológicos inducidos por la G-B sobre la frecuencia de descarga de las neuronas dopaminérgicas del AVT son consecuencia de una interacción de este compuesto con alguno de los sistemas de neurotransmisores descritos en esta área, entonces su administración debe mimetizar algunos de los efectos de fármacos agonistas o antagonistas a estos sistemas de neurotransmisores.

V. OBJETIVOS

- Describir el efecto de la aplicación sistémica de G-B sobre el patrón de descarga de las neuronas del AVT.
- Describir los efectos de la aplicación local de este mismo compuesto sobre las neuronas dopaminérgicas y no-dopaminérgicas del AVT.
- Determinar la acción de este compuesto sobre el potencial de membrana de las neuronas del AVT como un índice de sus efectos sobre la excitabilidad neuronal.
- Analizar los efectos de la aplicación del GABA, baclofen, bicuculina, clonazepam y flumazenil, sobre el potencial de membrana y sobre los potenciales postsinápticos, inducidos por estimulación eléctrica de campo, de las neuronas del AVT en rebanadas de cerebro.
- Determinar el efecto que la G-B induce sobre los efectos de tales fármacos en la misma preparación
- Analizar los efectos que la aplicación de glutamato y el antagonista CNQX de receptores NMDA inducen sobre el potencial de membrana y los potenciales postsinápticos inducidos por la estimulación de campo.
- Describir los efectos que la G-B y la dopamina inducen sobre aquellos provocados por el glutamato y su antagonista en estos mismos parámetros.

VI. MATERIAL Y METODOS

a. COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL

La planta fué colectada en agosto de 1995 en el poblado de Doctor Mora, localidad situada en el estado de Guanajuato, a 2,000 m.s.n.m., donde se le encontró creciendo en forma silvestre, en terreno pedregoso que presentaba diversos grados de perturbación. El material vegetal obtenido se hallaba en plena floración y fue determinado por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras del Herbario IMSSM, en donde se depositaron ejemplares para futuras referencias bajo los números: 8645 y 8646.

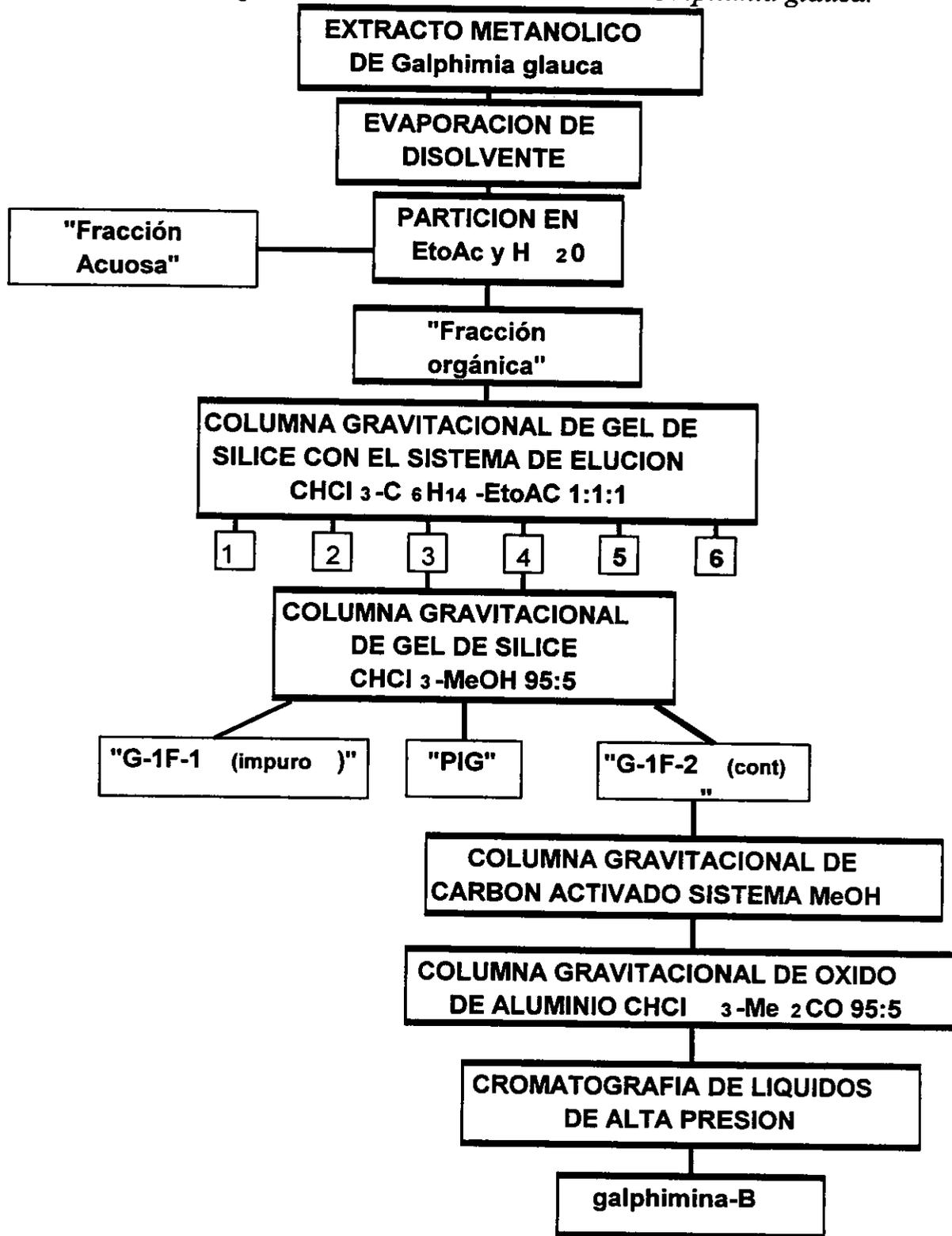
b. PROCEDIMIENTOS QUIMICOS PARA LA OBTENCION DE GALPHIMINA-B

Las hojas de la planta una vez que habían sido secadas a temperatura ambiente y en la oscuridad (4,380 gr peso seco), fueron molidas y el material vegetal obtenido se extrajo durante 48 horas por maceración con éter de petróleo. El material vegetal desengrasado fué colocado en una columna de vidrio de 88 cm de longitud y 11 cm de diámetro y extraído con metanol en forma exhaustiva por percolación. Cada 48 o 72 horas se realizaron recambios del disolvente durante 40 días, siempre a temperatura ambiente.

El extracto éter de petróleo fue desechado. El rendimiento para el extracto metanólico fué de 13.26%.

El método seguido para la obtención de la G-B se ilustra en el diagrama de flujo en la siguiente página. El extracto metanólico de *Galphimia glauca* Cav., fué evaporado a presión reducida en rotavapor hasta su completa sequedad, a continuación se le adicionó una mezcla de acetato de etilo y agua (3 : 2), llevando a cabo su partición en un embudo de separación para obtener

Procedimiento de separación química seguido para el aislamiento de galphimina-B a partir del extracto metanólico de Galphimia glauca.



dos porciones, una denominada "fracción acuosa" y otra "fracción orgánica". En los siguientes procedimientos de separación se utilizaron columnas gravitacionales de cromatografía, empacadas en gel de sílice (70 - 230 mesh, Merck), óxido de aluminio (activo, básico, Merck) o carbón activado (Merck). Las diversas fases sólidas así como la muestra problema se suspendieron en el mismo sistema de disolventes para su elución.

La "fracción orgánica" se separó en una columna cromatográfica de gel de sílice, usando como sistema de elución una mezcla de: cloroformo - hexano - acetato de etilo (1:1:1), dando por resultado la obtención de 6 fracciones diferentes. La fracción marcada con el número 3, así como la número 4, fueron reunidas bajo una misma denominación "fracción 3-4".

La fracción 3-4 fué recromatografiada en una columna de separación de gel de sílice eluída con el siguiente sistema de disolventes: cloroformo - metanol (95:5). De esta columna se obtuvieron tres productos: un pigmento de color amarillo intenso "PIG", otro denominado "G-1F-1(impuro)" y uno más denominado "G-1F-2(cont)". Por su parte "G-1F-2(cont)", fué sometida a despigmentación, pasándola a través de una columna empacada con carbón activado y eluída con metanol. El producto que se obtuvo al ser analizado en cromatografía de placa fina (PF) de gel de sílice con el sistema de disolventes cloroformo - metanol (95:5) y revelado por el reactivo de Erlich presentó 5 manchas de color violeta y fué denominada como "G-1F-2(mezcla)"; esta mezcla fue recromatografiada en una columna empacada con óxido de aluminio y eluída con el sistema cloroformo - acetona (95 : 5). Se obtuvo un producto que cristalizó en una mezcla de cloroformo - acetona, y al ser cromatografiado en PF de gel de sílice, en cloroformo - metanol (95:5) se reveló por RF como G-B con una pureza de un 75 %.

El procedimiento final de purificación se realizó con un equipo de cromatografía de líquidos de alta presión de la marca Merck-Hitachi. Se utilizó una columna semipreparativa de gel de Sílice fase normal (250 X 10 mm) y un sistema isocrático de elución con diclorometano-metanol 96:4.

Finalmente, a partir de procedimientos de cristalización utilizando cloroformo y acetona se logró la purificación de la G-B. Se utilizó la técnica de espectrometría de resonancia magnética nuclear para constatar la identidad y pureza del producto.

c. ANIMALES:

Para todos los experimentos se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, con pesos que oscilaron entre 180 y 220 g. Los animales fueron criados en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Estos fueron trasladados y mantenidos en condiciones del laboratorio durante al menos 15 días antes de su empleo experimental. Las condiciones de alternancia de luz y oscuridad, así como de temperatura, fueron rigurosamente mantenidas. El fotoperiodo artificial fue de 14 horas de luz por 10 de oscuridad. La luz se iniciaba a las 6:00 y finalizaba a las 20:00, gracias al empleo de un interruptor conectado a un medidor electrónico de tiempo. La temperatura se mantuvo en 25 ± 1 °C.

Todos los animales se mantuvieron en cajas de plexiglass individuales con acceso libre al alimento (Purina Rat Chow) y al agua en bebederos metálicos. Todos los días a las 8:00 horas se determinaba el peso corporal y las condiciones generales de los animales, cambiándose en ese momento el aserrín de las jaulas. Únicamente aquellos animales que se encontraron en óptimas condiciones fueron empleados en alguna de las fases experimentales.

d. REGISTROS EXTRACELULARES EN ANIMALES INTEGROS

Los registros extracelulares en animales íntegros se realizaron en diferentes sesiones de registro electrofisiológico, para ello, se emplearon 38 animales en los cuales se registró la actividad extracelular de las neuronas del AVT y se analizó el efecto de la aplicación, ya sea intraperitoneal (n=23) o local por micropresión (n=32), de G-B.

Bajo anestesia general (Uretano 1.25 g/Kg) a todos los animales se les introdujo una cánula endotraqueal, para posteriormente fijarlas en un aparato estereotáxico. La actividad extracelular se registró por medio de micropipetas de vidrio (borosilicato sódico) estiradas hasta obtener puntas de 1 a 2.5 μm de diámetro. Estas micropipetas, que fueron llenadas con una solución de NaCl (2M), mostraron resistencias óhmicas *in situ* que oscilaron entre 18 y 27 M Ω , lo cual garantiza registros unitarios con buenas posibilidades de discriminación. Los electrodos de registro se descendieron y colocaron en la región del AVT por mapeo, siguiendo las coordenadas descritas en el "Atlas Estereotáxico del cerebro de la rata" de Pellegrino, Pellegrino y Cushman (57).

Una vez localizada una espiga (potencial de acción unitario) en la zona referida, se analizaba su estabilidad a través del registro continuo por un periodo de al menos 30 minutos, posterior a ello, se iniciaba el registro de la actividad basal, en el cual se determinaban las características de la descarga eléctrica extracelular tales como frecuencia, duración, morfología, tamaño y patrón. Este registro basal que duraba 15 minutos era seguido por la aplicación ya sea intraperitoneal (*i.p.*) o local por micropresión de G-B.

Para su aplicación *i.p.* la G-B fue diluida en una solución de polietilenglicol al 10% y se emplearon dosis de 0.5, 1.0 y 2.5 mg/Kg; después de aplicar el fármaco se continuó el registro por 60 minutos más. En estos casos se registraba sólo una célula por animal con el objeto de evitar efectos acumulativos del fármaco. Un grupo de animales (n=6) fue utilizado con fines de control; en ellos, se aplicó 1 ml de una solución de polietilenglicol al 10%.

Para la aplicación por micropresión, se fabricaron microelectrodos con micropipetas múltiples (3 micropipetas), con punta de 4 a 8 μm y una resistencia óhmica, medida *in situ*, de 15 a 18 M Ω . Una de las pipetas se empleaba para el registro de la actividad basal, mientras que otra contenía una solución 0.1 M (pH=5.7) de G-B disuelta en polietilenglicol al 10%, la tercer pipeta se llenó con una solución de polietilenglicol al 10% y verde rápido a concentración saturada y su expulsión se realizó únicamente con fines de

control y para marcar el sitio de registro. La multipipeta se colocaba en la vecindad inmediata de la célula, lo cual se determinaba por el punto de mayor tamaño del potencial registrado. Se utilizaron presiones de 5 a 50 psi para expulsar a la G-B o a la solución vehículo. Los electrodos fueron colocados en el AVT gracias a un micromanipulador hidráulico que permitía desplazamientos de hasta una micra y el cual se activaba desde fuera de la cámara de faraday.

Al final de cada sesión se administraba una corriente catódica a través del electrodo a fin de depositar un colorante y con ello marcar el sitio de registro, después, los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital; su cerebro fue extraído y almacenado en una solución de formaldehído al 10% durante al menos 2 semanas, al final de las cuales se realizaban cortes histológicos del cerebro para localizar los sitios de registro. Para fines de descripción de los resultados, sólo aquellos registros que se realizaron dentro del AVT fueron considerados, esto eliminó aproximadamente un 30% de las células registradas.

e. REGISTROS UNITARIOS EXTRA E INTRACELULARES EN NEURONAS DEL AVT EN REBANADAS DE CEREBRO DE RATA

Al inicio de la sesión experimental las ratas fueron anestesiadas con halotano inhalado durante 25 seg, lo cual fue suficiente para provocar una anestesia quirúrgica. Una vez en este plano, los animales fueron decapitados utilizando una guillotina de fabricación casera; después de exponer el cráneo, con unas tijeras se realizaba un corte medial longitudinal a todo lo largo del cráneo y con unas gubias se exponía todo el cerebro. Con cuidado se retiraba éste evitando lesionar el tracto óptico ni el resto de los nervios craneales. Una vez que se removía el cerebro completo, éste se colocaba en una solución con composición similar al líquido cefalorraquídeo la cual contiene en mM: NaCl 124, KCl 5.0, NaH₂PO₄ 2.6, NaHCO₃ 26, dextrosa 10, HEPES 10, MgSO₄ 2.0 y CaCl₂ 2.0. Esta solución se encontraba a 4°C y estaba siendo continuamente

aereada con una mezcla de O₂ al 95% y CO₂ al 5%. El tiempo transcurrido entre la decapitación y la inmersión del cerebro en esta solución nunca fue mayor a 120 segundos. Inmediatamente se procedió a disecar el tallo cerebral y particularmente el mesencéfalo y se seleccionó un bloque de tejido que contenía estructuras diencefálicas y mesencefálicas. Este bloque se colocaba en la platina del vibratomo (Camden, Engl.) con una inclinación anteroposterior con respecto a la cuchilla (la parte anterior se levantaba 12°). Para conseguir esto se preparaba una rampa de agar que daba tal inclinación y se colocaba la porción anterior del bloque del tallo hacia la cuchilla del vibratomo. Una vez en esta posición, se obtenían las rebanadas correspondientes, las cuales tenían un grosor de 450 µm, por lo que se lograban hasta de 2 o 3 rebanadas por animal. Inmediatamente después, las rebanadas se transferían a una cámara de incubación de 15 cms de diámetro con varias pozas, la cual contenía la misma solución a 4 °C, continuamente aereada. Las rebanadas permanecían en esta solución para equilibrarse y recuperarse del shock traumático durante 60 a 90 minutos antes del registro. Transcurrido este período, las rebanadas se transferían a una cámara de registro (de fabricación casera), la cual era continuamente perfundida con el mismo tipo de solución, pero ahora a una temperatura de 35 ± 1 °C. La poza de registro es de 2 ml y la velocidad de flujo osciló entre 2.5 y 3 ml por minuto. Esta solución se encontraba en un baño maría que la mantenía en una temperatura de 32 ± 1 °C y estaba siendo aereada con una mezcla de O₂, al 95% y CO₂ al 5%.

La cámara de registro se encontraba sobre una mesa vibroaislante que eliminaba al máximo las vibraciones. Por encima de la cámara se localizaba el objetivo de un estereoscopio para la visualización integral de la rebanada, la localización macroscópica de las estructuras a registrar y la colocación de la punta del electrodo sobre las mismas. La solución de infusión llega a la cámara de registro a una temperatura de 32 ± 1.0 °C gracias a un sistema de contracorriente. Este sistema emplea una bomba que hace circular agua caliente (40.0 ± 0.5 °C) por un tubo de mayor calibre (2.4 y 3.8 mm; diámetros interno y externo, respectivamente), mientras que la solución de infusión

circula, gracias a la acción de la gravedad, por un tubo de menor calibre (1.1 y 1.7 mm, diámetros interno y externo, respectivamente), localizado dentro del primero. Tal arreglo permite una transferencia de calor desde el agua caliente hacia la solución de tal manera que cuando la solución de infusión alcanza la cámara de baño donde se encuentra la rebanada de cerebro, su temperatura es de 32 ± 1.0 °C. En estos experimentos nunca se emplearon temperaturas mayores a 33 °C durante el registro, porque esto tendía a decrementar la duración de la viabilidad de las rebanadas.

Los microelectrodos de registro y estimulación de campo fueron colocados dentro de la cámara de registro y colocados en los sitios elegidos de la rebanada mediante un micromanipulador (Newport MX300R), con la ayuda de un microscopio fotónico (Carl Zeiss).

1) Registros extracelulares en neuronas del AVT.

Con la ayuda de un microscopio de disección y de transiluminación de la rebanada, la región AVT era identificada visualmente como un área medial al lemnisco medio y ventral al núcleo rojo. En secciones más rostrales, el AVT se localizaba medial hacia el núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio, el cual separa el AVT de la sustancia *nigra*.

Los registros extracelulares fueron hechos con microelectrodos de vidrio llenos con una solución de cloruro de sodio (3M). La resistencia de los microelectrodos fue de 15-20 M Ω , medida a 130 Hz. Los potenciales de acción fueron amplificados y mostrados en un osciloscopio y aislados del ruido de fondo por una ventana discriminadora activada por voltaje. Los pulsos de salida del discriminador fueron alimentados a una computadora IBM-compatible, la cual podía construir en línea, histogramas de frecuencia. Este programa calculaba la frecuencia de descarga, la actividad en ráfagas y los histogramas de intervalos interespigas de la información almacenada.

La frecuencia de descarga, antes, durante y después de la aplicación de fármacos fue calculada, así como el número de espigas promediadas sobre un periodo de épocas de 60 segundos. Durante la aplicación de la droga, la frecuencia de descarga fue determinada a partir de mediciones de la actividad neuronal, 30 segundos antes y 30 segundos después de la respuesta máxima. Los cambios en la frecuencia de descarga son expresados como el cambio absoluto en espigas/segundo de la línea basal. Los criterios para identificar la actividad en ráfagas usaron un intervalo interespigas de ± 80 mseg para el primer par de espigas en un tren y determinaba el inicio cuando el intervalo entre 2 espigas excedía 160 mseg.

2) Registros intracelulares en neuronas del AVT.

Los registros intracelulares fueron realizados utilizando microelectrodos de vidrio llenos con acetato de potasio 3 M. Estos electrodos provenían de micropipetas de borosilicato potásico, estiradas en un flamómetro (Sutter A8), hasta obtener puntas con impedancias de 70 a 100 M Ω a 1 Khz. A estos microelectrodos se les introducía un alambre de plata clorada, el cual estaba conectado a la sonda de super alta impedancia (> 1 G Ω , Headstage 1A, Axon Instruments, USA). Para fines de colocación, esta sonda se fijaba sobre un micromanipulador (Newport MX300R) que permitía desplazamientos hasta de 0.1 μ m. Una vez colocado, el microelectrodo se desplazaba sobre la zona de células del AVT con monitoreo constante de la diferencia de potencial entre este microelectrodo y el indiferente (un cable de plata clorada, inmerso en la solución del baño). Cuando el microelectrodo se localizaba en el espacio extracelular, esa diferencia de potencial era igual a 0, sin embargo, una vez que el microelectrodo se encontraba en el interior de alguna célula se detectaba una caída en el potencial, la cual era proporcional al potencial de membrana de la célula penetrada. En este estudio se analizaron sólo aquellas neuronas que mostraban un potencial de membrana más negativo que -65 mV y que poseían una resistencia de entrada de la membrana mayor a 40 M Ω .

Valores inferiores a los mencionados sugieren que las condiciones generales de estas células estaban decayendo.

La resistencia de entrada de las células se calculaba de la deflexión de voltage producida por pulsos de corriente hiperpolarizante (0.1 - 0.3 nA) con 50 mseg de duración. Aunque en muchos de los casos el potencial de reposo no cambiaba a través del experimento, oscilaciones pequeñas y aleatorias durante el periodo de lavado fueron compensadas manualmente cuando así se requeria.

Los efectos de los fármacos en los registros intracelulares se midieron sobre el valor absoluto del potencial de membrana y sobre la amplitud de las respuestas sinápticas provocadas por la estimulación eléctrica de campo, la cual consistía de pulsos eléctricos (10-50 μ A, 25-100 μ seg, 0.05-0.066 Hz), aplicados a través de microelectrodos bipolares localizados en las inmediaciones del AVT. El potencial de membrana, así como los potenciales postsinápticos excitadores e inhibidores fueron registrados utilizando un amplificador Axoclamp-2B (Axon Instruments, USA). Estas señales fueron digitalizadas a 25 o 100 KHz con una interfase TL1 (Axon Instruments, USA), dependiendo de si se estudiaban potenciales postsinápticos o potenciales de acción, respectivamente. Estos datos fueron entonces analizados en una computadora 486 PC compatible (Digital, USA) usando el software de PClamp (Axon Instruments, USA).

Se determinó la máxima amplitud del potencial postsináptico con respecto a la línea basal. Esta línea basal se consideraba como el valor medio de la señal, tomada a través de una ventana de 2-5 mseg, precediendo al artefacto de estimulación. Los datos fueron normalizados con respecto a los valores medios de las respuestas en un periodo control de 20 min, antes de la aplicación de los fármacos. Los resultados se expresaron como promedios \pm error estándar.

Los fármacos empleados se disolvían en sus respectivos vehículos en concentraciones que oscilaron entre 10^{-9} y 10^{-4} M, que además contenía una

concentración de 0.5 μ M de tetrodotoxina, la cual bloquea los canales de sodio y se depositaban en un sistema de jeringas cuya salida, realizada por un tubo de silastic del no. 27, se controlaba a través de una pinza manual. Todos los tubos de silastic se conectaban a un sistema de capilares de vidrio, en el interior de un tubo de plástico el cual les proporcionaba un baño maría, que calentaba hasta 32 ± 0.5 °C la solución y que estaba montado sobre un micromanipulador (narishige 432R), permitiéndole desplazamientos de hasta 1 μ m. La punta de los capilares de este sistema se visualizaba a través del microscopio estereoscópico por lo cual era factible colocar esta punta muy cerca de la célula que se estaba registrando. Al quitar la pinza en forma manual, la solución con el fármaco a una temperatura de 32 °C, fluía hacia la célula que se estaba registrando, a una velocidad de 100 μ l por minuto. Al final de registro, se fijaban las rebanadas en una solución de paraformaldehído (4 %) para su almacenamiento y posterior análisis histológico.

VII. RESULTADOS

a) REGISTROS EXTRACELULARES EN ANIMALES INTEGROS

En los registros realizados extracelularmente de las neuronas del AVT se distinguieron dos patrones diferentes de actividad eléctrica "espontánea". El más abundante (57% de las neuronas registradas) estaba constituido por espigas con un rango de frecuencia de 2 a 9 espigas/segundo (promedio \pm D.E. 4.2 ± 1.9). Estas espigas se caracterizaron por la presencia ocasional de ráfagas de descarga (bursts), las cuales pueden ser claramente identificadas por estar constituidas por: 4 a 6 espigas bifásicas con una amplitud decreciente y una duración creciente de la espiga en forma progresiva (Fig. 8). Durante todo el tiempo de registro las ráfagas mostraron un patrón muy estable y no se observaron cambios cuando la punta del electrodo se desplazaba a lo largo de la célula hasta una distancia de 30 μm . Las espigas de estas ráfagas fueron típicamente bifásicas (positivas-negativas), con una amplitud que osciló entre 0.4 a 1.5 mV. El segundo patrón de actividad registrado (43 % de las células) se trató de espigas únicas, sin actividad en ráfagas y con frecuencias más altas; el promedio de descarga fue de 9.8 ± 3.2 espigas/segundo (con un rango entre 3.2 y 17.6) (Fig. 9).

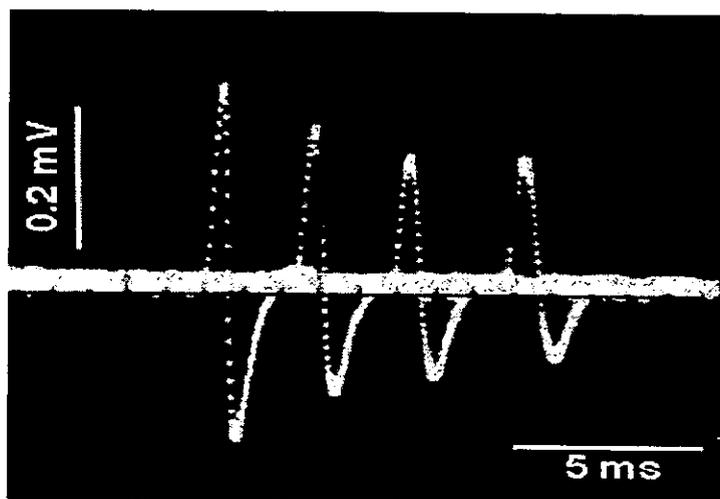


Fig 8.

Fotografía tomada directamente de la pantalla del osciloscopio donde se aprecia un patrón de descarga con disparos en ráfaga. El 57% de las neuronas registradas en el AVT mostraron esta forma de descarga.

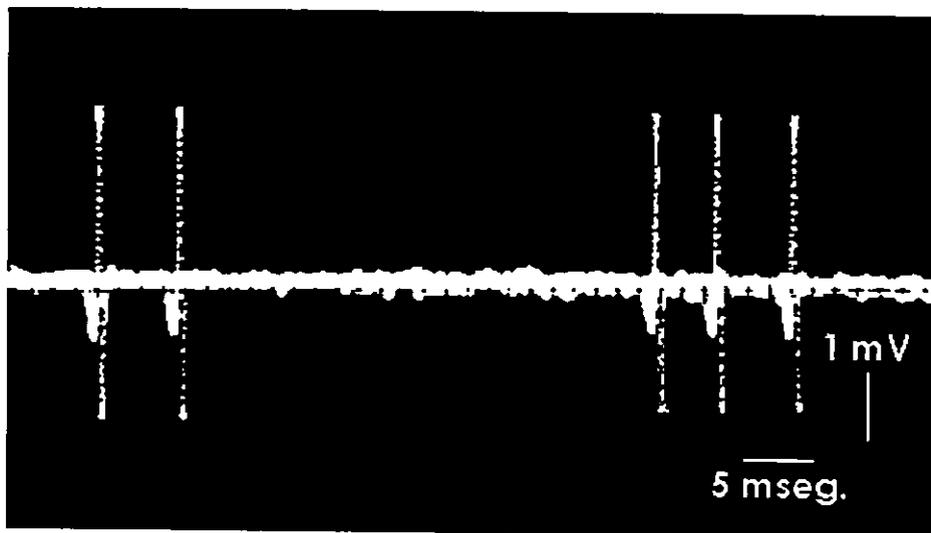
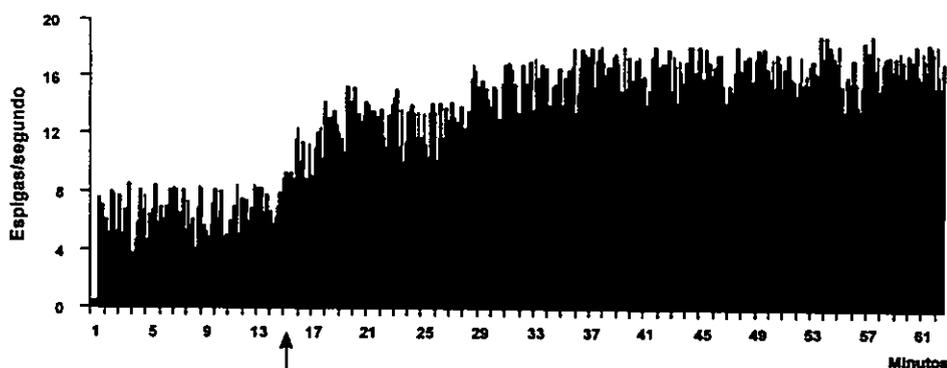


Fig. 9.

Registro que ilustra un patrón de descarga en forma simple, sin ráfagas. El 43 % de las neuronas registradas en el AVT mostraron esta forma de descarga, sin modificaciones subsecuentes en el tamaño o duración de las espigas.

En todos los registros, la proporción señal-ruido nunca fue menor a 5 a 1. Los efectos provocados por la administración de la G-B se observaron exclusivamente sobre la frecuencia de descarga de las neuronas; ni el tamaño, ni la duración de las espigas fueron modificados por el fármaco.

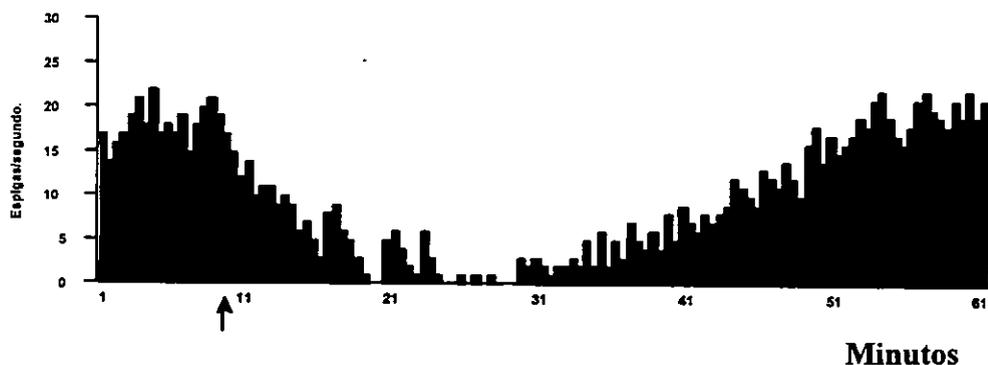
El efecto de la aplicación *i.p.* de G-B fue analizada en 23 neuronas de la región del AVT, 14 de las cuales mostraron descargas en ráfagas y 9 descargaban con espigas simples. Las dosis aplicadas en este experimento oscilaron en un rango de 0.5 a 2.5 mg/Kg. La G-B provocó un incremento relacionado con la dosis, de la actividad eléctrica en las 14 neuronas que descargaban en ráfagas (Fig. 10), mientras que en las 9 células con descarga simple, sólo 4 células fueron afectadas por la G-B, con un decremento en su frecuencia de descarga (Fig. 11).



GB

Fig. 10.

Histograma de frecuencias que muestra el efecto que produjo la administración intraperitoneal de galphimina-B (1mg/kg) en neuronas que descargaban en ráfagas. En todos los casos se observó un incremento de la frecuencia de descarga. La flecha indica el tiempo de administración.



GB

Fig 11.

Histograma de frecuencias que muestra el efecto que produjo la administración intraperitoneal de galphimina-B (1mg/kg) en neuronas que no mostraban descargas en ráfagas. En cuatro de nueve neuronas registradas se observó un decremento de la frecuencia de descarga. La flecha indica el momento de la aplicación.

Los efectos excitadores como los inhibidores inducidos por este compuesto mostraron una latencia de inicio después de su aplicación intraperitoneal, de entre 2 y 4 minutos y una duración que osciló entre 30 y 50 minutos, dependiendo de la dosis administrada, el efecto máximo casi siempre se observó de 20 a 30 minutos después de su aplicación.

Cuando el fármaco se aplicó en forma local por micropresión, también se observaron efectos dependientes del tipo de descarga que presentaba la neurona en condiciones basales, entonces, de las neuronas registradas con esta técnica y que descargaban en ráfagas (n=18), el 66% mostró una consistente depresión en su frecuencia de descarga, la cual se iniciaba de 4 a 8 segundos después de aplicada la micropresión y se mantenía todo el tiempo que duraba ésta (Fig 12). Cuando el fármaco se aplicó por micropresión en neuronas que mostraron descargas únicas sin ráfagas (n=14), sólo tres de ellas mostraron un incremento en su frecuencia de descarga, con una dinámica similar a la observada en las células que descargaban en ráfagas. El efecto depresor de la G-B, cuya intensidad fue dependiente de la cantidad de micropresión utilizada, se mostró reproducible y consistente a lo largo de todo el registro. En estos registros también se observó que este compuesto solo modificó la frecuencia de descarga de las espigas, es decir, ni el tamaño ni la duración de las espigas mostró algún cambio por efecto del fármaco. Por su parte, la aplicación por micropresión de la solución vehículo con presiones de hasta 150 psi, no provocó algún efecto apreciable sobre los parámetros que se evaluaron.

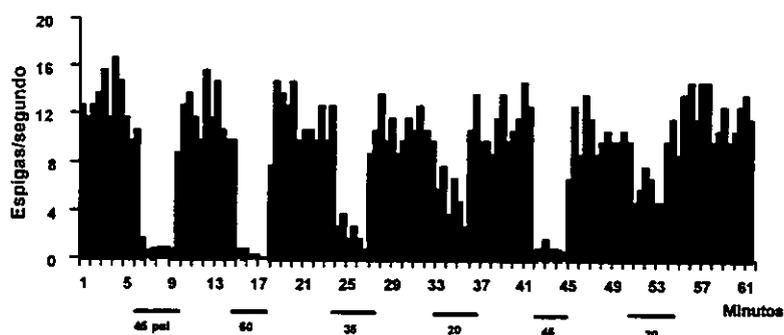


Fig. 12

Histograma de frecuencias que muestra el efecto producido por la aplicación local por micropresión de galphimina-B en una neurona que descargaba en ráfagas.

El análisis histológico de los cerebros utilizados, relacionó el efecto con el sitio del AVT registrado, se intento encontrar algún tipo de compartamentalización funcional, sin embargo, estos reultados mostraron que todas las neuronas se distribuyeron homogéneamente a lo largo de toda el AVT. La figura 13, muestra la distribución de las neuronas provenientes de animales que recibieron la aplicación de la G-B por vía *i.p.*; del lado derecho se muestran las neuronas que descargaban en ráfagas (n=14), mientras que del lado izquierdo las que lo hicieron en forma de descargas únicas. En ambos casos se observa una distribución homogénea, sin preferencia por algún sitio de ambos tipos de neuronas.

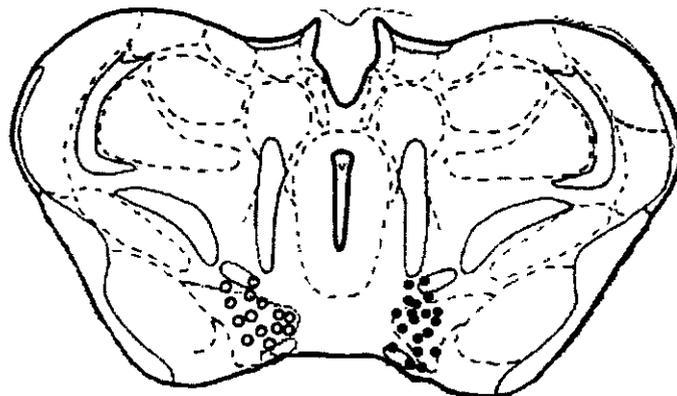


Fig. 13.

Esquema representativo de un corte transversal de cerebro de rata, que muestra la distribución de las neuronas que se encontraron con patrones de descarga en forma de ráfagas (figuras oscuras) y de las que descargaban en espigas únicas (figuras claras). Estas neuronas, aún cuando se representan en forma unilateral, su localización puede ser en cualquiera de ambos lados. Se observa una distribución homogénea de ambos tipos de neuronas.

b) REGISTROS EN REBANADAS DE CEREBRO DE RATA

1) Evaluación de la interacción con los sistemas GABAérgicos.

Se realizaron 43 registros intracelulares en rebanadas de mesencéfalo, pero, sólo 29 de ellos fueron considerados, el resto se eliminó por no cumplir

los requisitos de duración, valor de resistencia de entrada y/o potencial de membrana. Estos 43 registros provienen de 38 rebanadas del tallo cerebral. En todos ellos se analizó la actividad intracelular de las neuronas del AVT y se evaluó el efecto de la aplicación de alguno o varios de los siguientes fármacos: tetrodotoxina, G-B, GABA, baclofen, cionazepam, bicuculina, flumazenil, dopamina, glutamato y CNQX.

El potencial de membrana de estas células en promedio fue de -73.4 ± 12.3 mV (rango -60.7 a -79.7 mV, $n=29$), mientras que la resistencia de entrada mostró valores promedio de 65.4 ± 7.6 M Ω . (rango 49.8 a 78.4 M Ω , $n=29$).

En el 82.7 % ($n=24$) de las neuronas registradas, la aplicación de una estimulación de campo ($20 \mu\text{A}$, $50 \mu\text{seg}$, 0.05 Hz) generó cambios en el potencial de membrana (los electrodos bipolares de estimulación se localizaban entre 100 y $500 \mu\text{m}$ posteriores al AVT). Del total de células que respondieron a esta estimulación de campo, 17 (70.83 %) mostraron una depolarización de la membrana celular, mientras que en las 7 células restantes (29.1 %), esta estimulación provocó una hiperpolarización importante. Ambos cambios del potencial de membrana se relacionaron temporalmente en una forma exacta con la estimulación de campo previa, lo cual indica que se trata de respuesta postsináptica (Fig. 14).

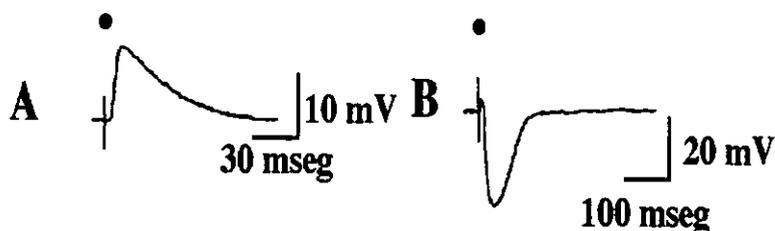


Fig. 14.

Registro en el que se aprecia el efecto que produjo la estimulación de campo sobre el potencial de membrana de neuronas del AVT. En "A" se muestra una despolarización y en "B" una hiperpolarización en dos neuronas distintas de la misma área. La latencia de ambas respuestas fue de 7.8 msec. Los puntos sobre ambos registros señalan los artefactos del estímulo.

Las depolarizaciones a estímulos únicos mostraron una latencia de 7.1 ± 0.9 mseg, con una duración de 83.2 ± 6.7 mseg y una intensidad que dependía a su vez de la intensidad de la estimulación, la cual, si era lo suficientemente intensa ($> 50 \mu\text{A}$), generaba potenciales de acción en estas neuronas. Por otro lado, las hiperpolarizaciones que presentaron estas neuronas también tuvieron una latencia similar, 7.34 ± 1.1 mseg, pero la duración siempre fue mayor, ésta fue de 119.3 ± 7.9 mseg. En forma similar la intensidad de tal hiperpolarización se relacionó con la intensidad de la estimulación de campo.

La aplicación de la G-B en las neuronas que respondieron con una depolarización a la estimulación de campo indujo una reducción en esta respuesta (Fig 15). Tal efecto fue dependiente de la dosis y mostró una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de $174.5 \mu\text{M}$ con efectos observables a los pocos mseg de iniciada la aplicación y que perduraron durante todo el tiempo que se mantenía la infusión, sin embargo, la G-B no bloqueó en su totalidad tal depolarización. El efecto más intenso observado fue una reducción del 78 % (Fig. 15). Cuando la intensidad de la estimulación de campo fue lo suficientemente alta, se generaron potenciales de acción, los cuales se sobreponían a los potenciales postsinápticos; estos potenciales también se inhibieron en presencia de G-B, tal como se muestra en la misma figura. La adición de una concentración $150 \mu\text{M}$ de G-B incrementó en un 47.6% la intensidad del estímulo necesaria para desencadenar un potencial de acción.

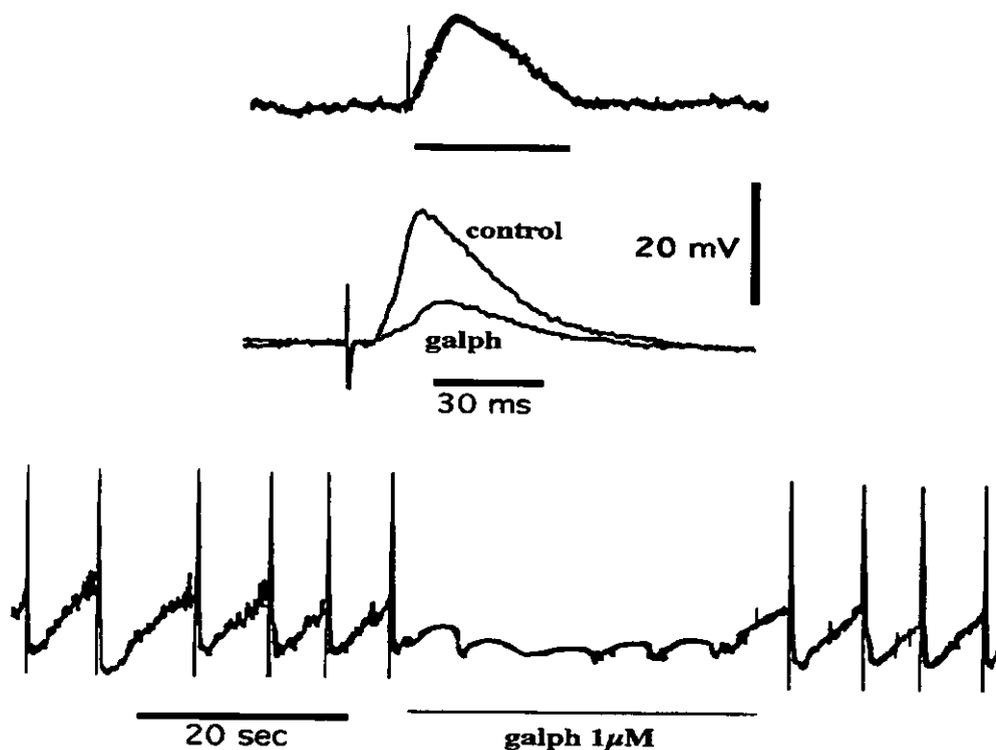


Fig. 15.

Registros que muestran el efecto producido por la aplicación de galphimina-B sobre los efectos excitadores provocados por la estimulación de campo en neuronas del AVT. En la parte superior de la figura se muestra una respuesta depolarizante típica, la cual se reduce significativamente en presencia de este compuesto (trazo medio). En la porción inferior de la figura, además del potencial postsináptico excitador registrado también se observa un potencial de acción. Ambos procesos fueron reducidos considerablemente durante la infusión de una solución con galphimina-B (100 μM).

La aplicación de GABA a esta misma preparación mostró resultados muy similares a los encontrados con la aplicación de la G-B. En estas circunstancias, la CI_{50} para GABA fue de 645 nM y con la dosis mayor empleada ($5 \times 10^{-4}\text{M}$), se obtuvo una inhibición cercana al 93% (Fig. 16). Los efectos provocados por la aplicación, ya sea local o a través de la solución de perfusión de GABA, fueron bloqueados en forma significativa por bicuculina y no fueron reproducidos por baclofén, un agonista de receptores de tipo GABA_B , lo que sugiere la participación de receptores tipo GABA_A en la

mediación de los efectos inhibidores desencadenados por la administración de este neurotransmisor (Fig. 17).

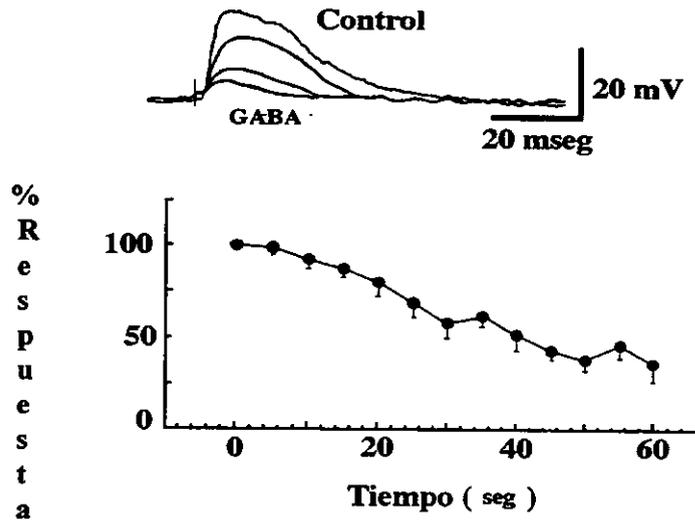


Fig. 16.

Registros en los que se muestra el efecto que produce la aplicación de GABA sobre la respuesta excitadora provocada por la estimulación de campo en neuronas del AVT. La adición de GABA a la solución del baño indujo un decremento significativo en la despolarización celular. En la parte superior de la figura se observa el efecto de añadir una concentración de 10^{-8} , 5×10^{-7} , 10^{-7} y 5×10^{-5} M. Esta última dosis provocó una reducción del 93% de tal respuesta. En la porción inferior se muestra el efecto, sobre una escala de tiempo, de una solución que contenía una concentración de 5×10^{-7} M de GABA, perfundida durante 60 segundos a la rebanada; esta dosis, después de 1 minuto provocó una reducción del 70% aproximadamente.

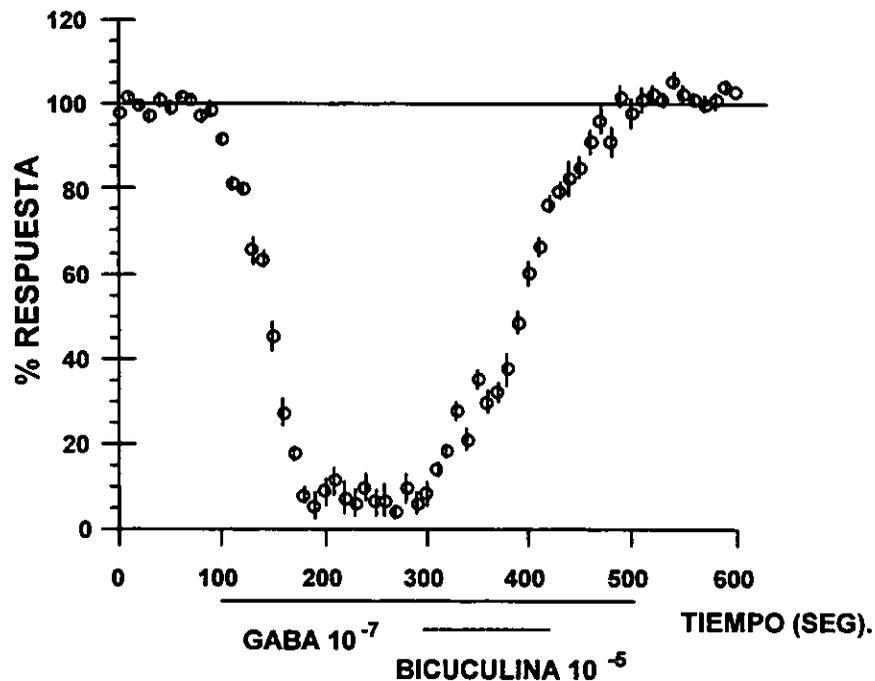


Fig. 17.

Grafica que muestra como la administración de bicuculina, en dosis que oscilaron entre 10^{-9} y 10^{-4} M ($CI_{50} = 3.32 \mu M$), bloquearon el efecto depresor provocado por la adición de GABA (3×10^{-7} M) sobre los potenciales postsinápticos excitadores inducidos en neuronas del AVT. Un efecto muy similar se observó cuando el agente bloqueador fue la picrotoxina, la cual mostró una $CI_{50} = 567 \mu M$ para la misma concentración de GABA.

En un intento de caracterizar en una forma más específica la porción del receptor GABAérgico involucrado en esta acción, se decidió analizar el efecto del clonazepam, una benzodiazepina con perfil ansiolítico y tranquilizante, la cual actúa sobre una porción específica del complejo GABA-receptor-ionóforo de cloro. La especificidad de esta benzodiazepina se determinó empleando un bloqueador de este tipo de receptores: el flumazenil. En estas circunstancias, la administración del clonazepam, al igual que la del GABA y la G-B, provocó

una reducción significativa en el tamaño del potencial postsináptico excitador, pero, este efecto fue menor en intensidad. El efecto encontrado con la dosis mayor empleada (10^{-4} M) fue una reducción del 48.7 %, observada entre 2.5 y 4 segundos después de aplicado el fármaco. La administración simultánea de flumazenil, en concentraciones tan bajas como 3×10^{-7} M, redujo en un 100% el efecto depresor del clonazepam (Fig. 18).

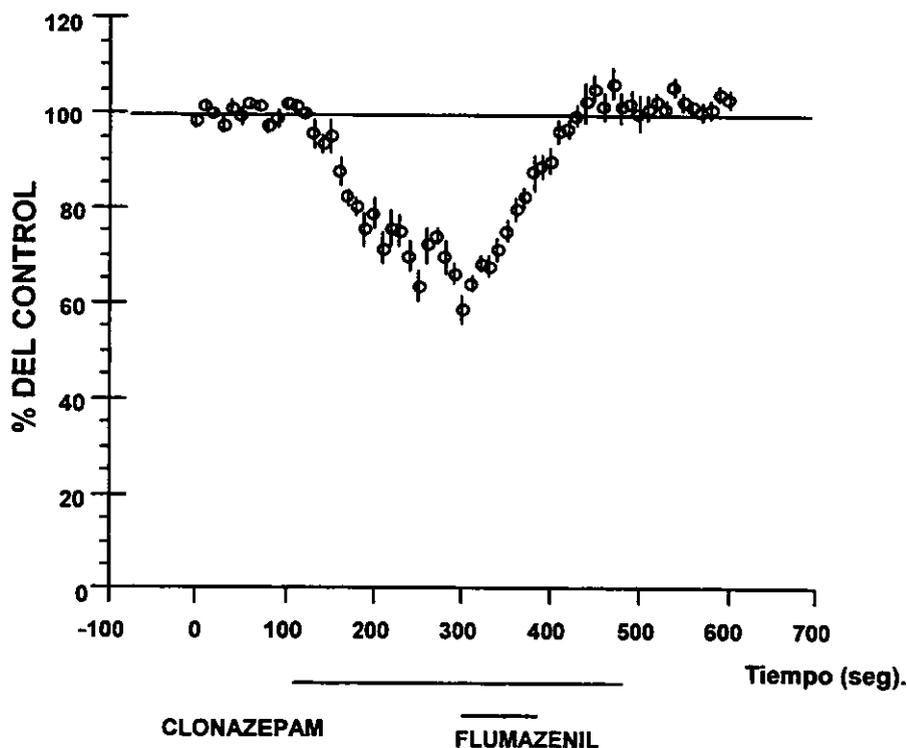


Fig. 18.

Grafica que muestra como la perfusión de flumazenil, un agente bloqueador del receptor benzodiazepínico localizado en el complejo GABA-receptor-ionóforo de cloro, bloqueó el efecto depresor provocado por la adición de clonazepam sobre los potenciales postsinápticos excitadores inducidos en neuronas del AVT. Se puede observar que el efecto producido por el clonazepam es de menor intensidad que el logrado con GABA.

Quando en las mismas condiciones experimentales se añadió G-B, el 67% de las células registradas mostraron efectos depresores; esta sustancia desencadenó una reducción cuyo valor máximo fue del 78%. La perfusion con

una solución de 7×10^{-4} M de G-B produjo una inhibición cercana al 60%, la cual se instaló en su totalidad después de 10 a 15 segundos. A diferencia de los efectos desencadenados por el GABA y el clonazepam, ni la bicuculina, ni la picrotoxina, ni el flumazenil modificaron en algo los efectos depresores de la G-B (Fig. 19).

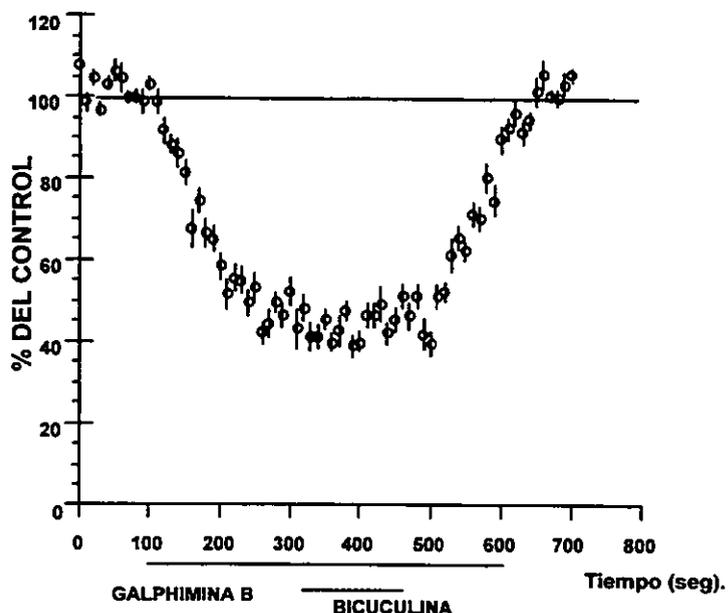


Fig. 19.

Gráfica que muestra el efecto depresor inducido por galphimina-B sobre los potenciales postsinápticos excitadores inducidos en neuronas del AVT. La respuesta fue muy similar a la encontrada con el GABA y el clonazepam, sin embargo, no fue bloqueada por la adición de bicuculina, picrotoxina (no ilustrado), ni flumazenil (no ilustrado), lo cual sugiere una acción no mediada a través de los receptores gabaérgicos de tipo A.

Comparativamente, los efectos desencadenados por la G-B fueron menos intensos que los observados con GABA, aunque en dosis equimolares, fueron más intensos que aquellos inducidos por clonazepam. Tanto la instalación de los efectos, como su duración fueron muy similares con el empleo de los tres compuestos depresores de la excitabilidad. De igual forma, una vez que estas sustancias fueron retiradas del medio de perfusión, los potenciales postsinápticos registrados recuperaron todas las características que mostraron durante sus condiciones de preadministración.

2) Evaluación del efecto de G-B sobre el potencial de membrana en condiciones basales

El efecto de la G-B se analizó también sobre el valor del potencial de membrana en condiciones basales, esto es, sin estimulación eléctrica de campo; de esta manera, es posible dilucidar entre una acción mediada a través de mecanismos presinápticos con aquellos postsinápticos. Esta parte del estudio se realizó en 16 neuronas, 9 de ellas respondieron con hiperpolarizaciones a la estimulación de campo y las otras 7 lo hicieron a través de depolarizaciones. La G-B mostró efectos en el 84 % de las neuronas registradas y su acción se mostró independientemente de si respondieron con hiperpolarización o con depolarización a la estimulación de campo. Tanto la administración de GABA (10^{-8} a 10^{-6} M) como de G-B (10^{-7} a 10^{-4} M) provocaron hiperpolarizaciones sostenidas y dependientes de la concentración administrada. Tal efecto mostró una latencia cercana a los 5 mseg y persistió, según la dosis, hasta 60 mseg después de la aplicación. En la figura 20 se muestra el resultado de la aplicación de 6 concentraciones diferentes de galphimina-B (1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} y 1×10^{-5} , 5×10^{-5} M) sobre el nivel de polaridad basal de una neurona del AVT. Estos efectos hiperpolarizantes inducidos por GABA son, sin lugar a dudas, consecuencia de su acción sobre el receptor GABA, a diferencia de los efectos producidos por la G-B, que como hemos visto anteriormente no interactúa con los receptores GABAérgicos.

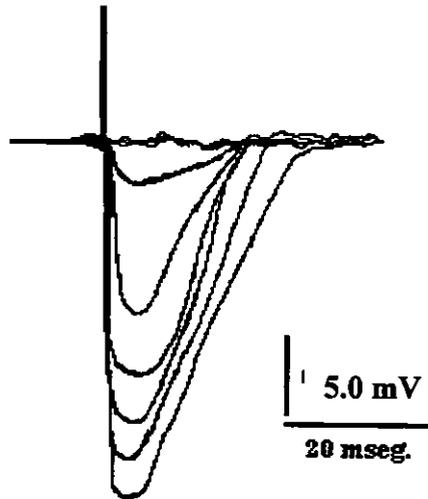


Fig. 20.

Registro de varias hiperpolarizaciones, hasta de 25 mV, producidas por pulsos de micropresión (25 psis, 5 msec) de 6 diferentes concentraciones de galphimina-B (1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} y 5×10^{-5} M). Los resultados fueron similares a los observados con la aplicación, también por micropresión, de GABA (no ilustrado).

3) Evaluación de la interacción con L-glutamato en registros extra e intracelulares en rebanadas de cerebro de rata

Los experimentos que analizaron la interacción entre la G-B y el L-glutamato en las neuronas dopaminérgicas se realizaron en 26 rebanadas de mesencéfalo. Aunque sólo una célula por rebanada fue registrada, la reversibilidad de los efectos de L-glutamato y demás fármacos permitieron que más de una concentración fuese probada durante un solo registro en una neurona determinada. Las neuronas dopaminérgicas mostraron potenciales de acción trifásicos, con dirección positiva-negativa-positiva y una duración mayor a 2 mseg (Fig. 21B). Estas descargas usualmente mostraron frecuencias muy bajas (1.2 ± 0.2 , con un rango de 0.03 a 2.9 espigas/seg) y se caracterizaron por poseer una actividad similar a un marcador del paso (Fig. 21A), la cual tiende a ser sumamente regular y constante a lo largo del tiempo, tal y como se observa en los histogramas de intervalos correspondientes (Fig. 21C). La aparición de descargas en ráfagas fue casi nula en los 26 registros realizados en esta área.

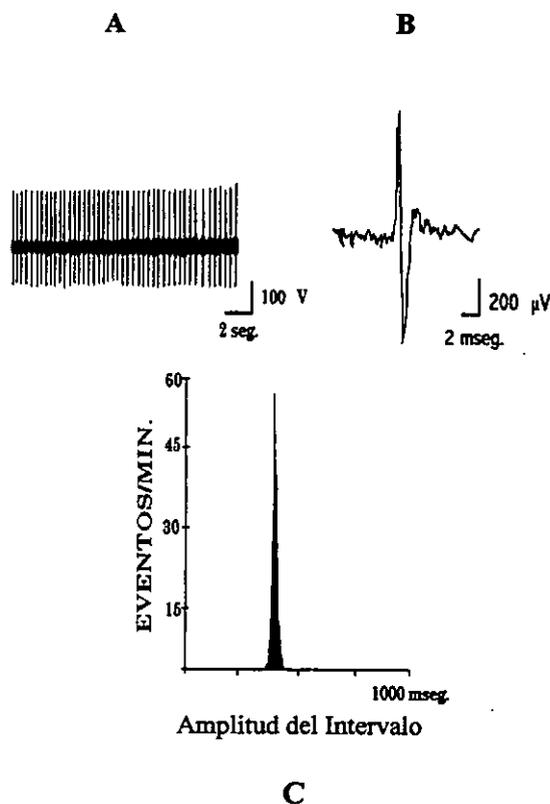


Fig. 21

Registros que muestran los criterios que se siguieron para seleccionar las neuronas dopaminérgicas del AVT: (A) frecuencia de descarga muy baja y regular, similar al observado en células tipo marcador de paso, (B) patrón trifásico positivo-negativo-positivo, (C) intervalos regulares como se muestra en el histograma de intervalos.

Otra de las características de estas neuronas dopaminérgicas registradas consistió en su alta sensibilidad a la administración de dopamina, por lo que el 98% de éstas, mostraron una depresión importante en su frecuencia de descarga por efecto de la administración de dopamina en concentraciones que oscilaron entre 10-100 μM (Fig. 22). Estos efectos mostraron una latencia dependiente de la concentración aplicada, la cual osciló entre 12 y 30 segundos, además, la duración del efecto siempre rebasó el tiempo de perfusión hasta con 90 segundos. Una vez que finalizaba la perfusión con la dopamina se observó, en ocasiones, una ligera disminución (10-15%) en el tamaño del potencial de acción e irregularidades en la frecuencia de descarga durante el periodo de recuperación (Fig. 22).

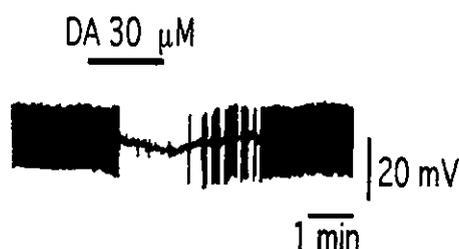


Fig. 22.

Registro que muestra la frecuencia de descarga espontánea de una neurona del AVT y el efecto producido al adicionar dopamina (30 μM) a la solución de perfusión. Se observó una depresión significativa de la frecuencia de descarga, la cual tuvo una latencia cercana a los 45 segundos y se mantuvo hasta un minuto después de retirada la catecolamina del medio.

Como se observa en la figura 23, estas mismas neuronas mostraron un efecto inhibitorio inducido por la administración de G-B en concentraciones de 50-150 μM y fueron excitadas por la adición de L-glutamato en concentraciones de 1-10 μM , este efecto fue bloqueado además por la administración previa de 300 μM de 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), un bloqueador específico de receptores tipo no-NMDA. En la mayoría de neuronas registradas se analizó el efecto de la administración conjunta de estos fármacos y mostraron que la administración simultánea de G-B (50-150 μM) con L-glutamato (5 μM) modificó en forma significativa la respuesta provocada por éste último, induciendo un bloqueo de casi el 100% de tal efecto; contrariamente, la administración conjunta de dopamina (50 μM) y L-glutamato (5 μM) no modificó tal respuesta (Fig. 23). La concentración

inhibitoria media (CI_{50}) del efecto bloqueador de la galphimina-B calculada en estos experimentos fue de $92.8 \mu\text{M}$.

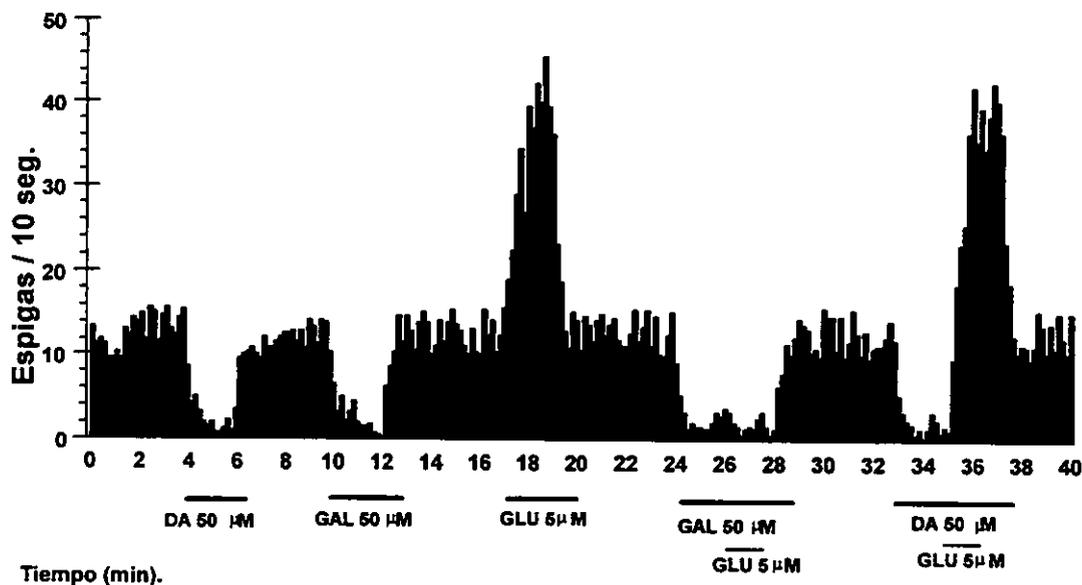


Fig. 23.

Histograma de frecuencias representativo que muestra los efectos provocados por la administración de dopamina (DA), galphimina-B (GAL) y L-glutamato (GLU) sobre la frecuencia de descarga de las neuronas del AVT.

Los efectos bloqueadores de la G-B sobre las acciones excitadoras del L-glutamato se observaron con todas las concentraciones empleadas en este experimento; la perfusión de L-glutamato en concentraciones de 10, 30 y $100 \mu\text{M}$ incrementó la frecuencia de descarga en un promedio de 0.3, 0.7 y 1.5 espigas por segundo respectivamente. Estos cambios absolutos representan el 18, el 37 y el 96% de incremento sobre la frecuencia basal (Fig. 24). El bloqueo inducido por G-B con la aplicación de una concentración de $10 \mu\text{M}$ de L-glutamato, aunque evidente, no fue estadísticamente significativo, por el contrario, con las concentraciones de 30 y $100 \mu\text{M}$ de L-glutamato, la G-B indujo un bloqueo significativo ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) en ambas concentraciones (Fig. 24).

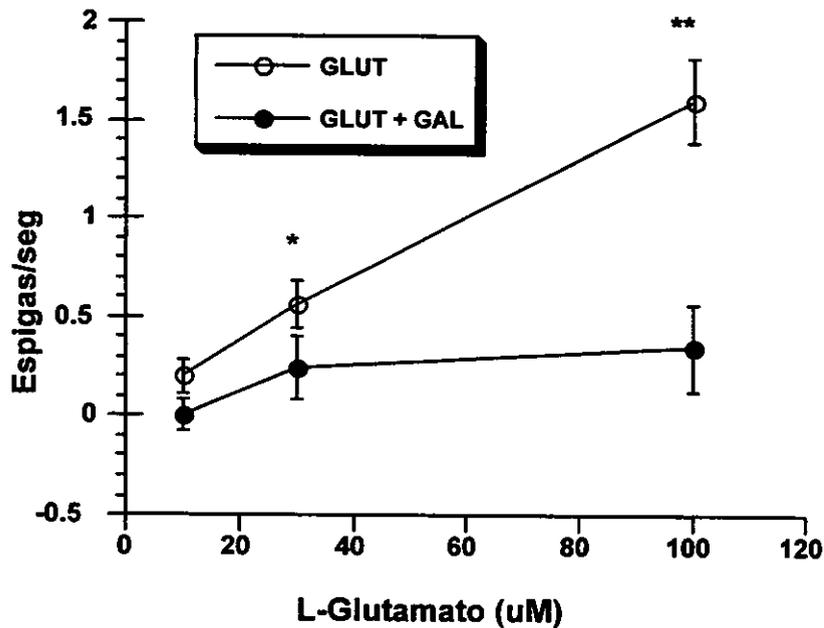


Fig. 24.

*Gráfica que muestra la actividad de galphimina-B (GAL) sobre los efectos excitadores inducidos por la administración de L-glutamato (GLUT). El efecto fue más evidente con el empleo de concentraciones mayores del neurotransmisor. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ ($n=8$).*

En los registros intracelulares de estas neuronas se determinó un potencial de membrana promedio de -58 ± 4.24 mV (con un rango de -47 a -77 mV); estos valores fueron registrados después de añadir al baño una concentración de $1 \mu\text{M}$ de tetrodotoxina (TTX), la cual bloquea las diversas corrientes de sodio. De esta manera se eliminaba también cualquier manifestación de la actividad de tipo marcador de paso de estas neuronas. En las que no se añadía la tetrodotoxina o en registros realizados después de lavadas las células para eliminar la toxina, se mostró que la actividad de marcador del paso de estas células se asociaba con un potencial de membrana sumamente inestable, que provocaba una despolarización espontánea, la cual al alcanzar el nivel umbral, provocaba la descarga de un potencial de acción. Estos fenómenos se repetían con una uniformidad consistente (Fig. 25).

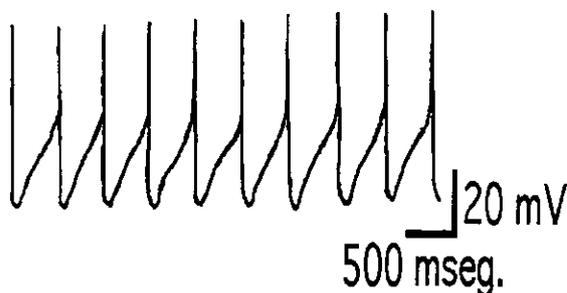


Fig. 25.

Registros del patrón de descarga en registros intracelulares en condiciones basales y antes de ejecutar cualquier maniobra experimental. La característica fundamental fue la presencia de descargas espontáneas asociadas con un potencial de membrana inestable.

En condiciones de registros intracelulares sin fijación de voltaje y en presencia de TTX 1 μ M, la adición en pulsos de L-glutamato 5 μ M indujo depolarizaciones (PPSE) significativas que se mantuvieron durante varios milisegundos (Fig. 26); estas pudieron ser reducidas por la adición conjunta de una determinada dosis de G-B. Estos efectos se manifestaron sobre todo, con concentraciones de 5×10^{-5} M y 10^{-4} M del neurotransmisor, por ejemplo, con una concentración de 10^{-4} M se observó un bloqueo cercano al 92% del efecto inducido por este aminoácido excitador (Fig. 27).

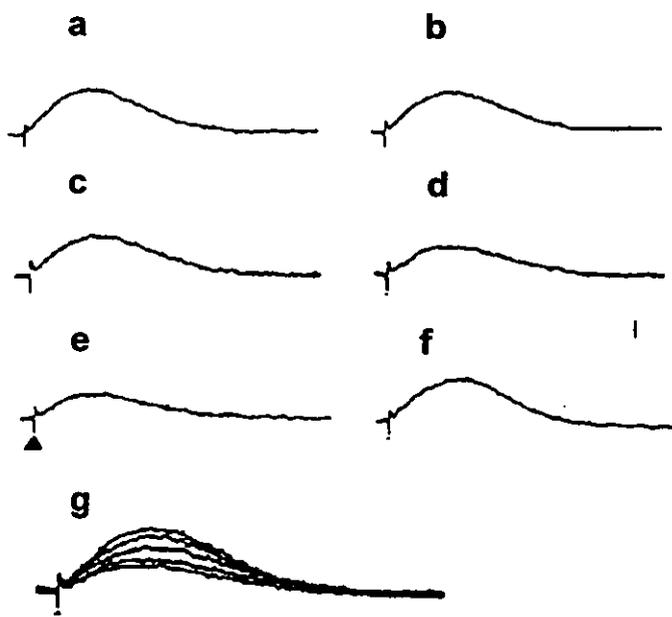


Fig. 26. Registro que muestra los potenciales postsinápticos excitadores excitadores inducidos por la adición de pulsos de L-glutamato. En "a" se aprecia el efecto de la aplicación de un pulso durante 100 μ seg de una solución que contiene 5 μ M de L-glutamato, mientras que "b", "c", "d" y "e" muestran la adición del mismo pulso de glutamato pero después de la adición de 10, 30, 60 y 90 μ M de galphimina-B respectivamente. En "f" se muestra el efecto provocado por L- glutamato 5 minutos después de retirar la galphimina-B de la preparación; "g", muestra los registros de "a" hasta "f" sobrepuestos, como un artificio para apreciar los efectos producidos por G-B.

después de retirar la galphimina-B de la preparación; "g", muestra los registros de "a" hasta "f" sobrepuestos, como un artificio para apreciar los efectos producidos por G-B.

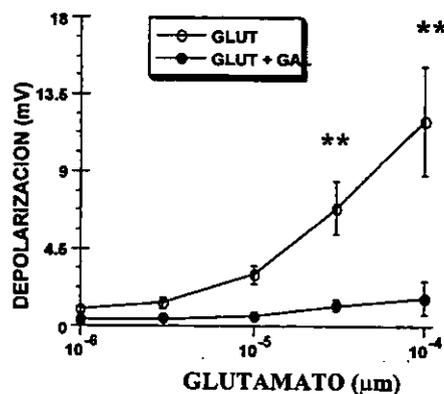


Fig. 27.

Gráfica que muestra el efecto producido por la adición de diferentes concentraciones de l-glutamato (GLUT) sobre la despolarización de la membrana de células pretratados con tetrodotoxina 1 μ M. La concentración de 1×10^{-4} M produjo una despolarización de 11.8 mV. La adición previa de galphimina-B (GAL) en concentración de 100 μ M, bloqueó consistentemente este efecto despolarizante. **= $p < 0.01$ ($n=8$)

Cuando los registros intracelulares se realizaron en ausencia de tetrodotoxina, se mostró que la adición de L-glutamato en las mismas concentraciones indujo la aparición de ráfagas de espigas sobrepuestas a los

potenciales postsinápticos excitadores; estas ráfagas consistían de 4 a 6 espigas, con una duración de 100 a 150 mseg; cada espiga mostró una duración de 5 a 8 mseg y frecuentemente, la primer espiga fue la de mayor amplitud, mientras que las restantes fueron paulatinamente de menor tamaño. El 96% de las neuronas registradas intracelularmente mostraron este tipo de descargas por efecto de la adición de una dosis de 5 μM de L-glutamato. La adición al baño de una solución que contenía una concentración de 100 μM de G-B provocó que, tanto la generación de espigas en forma de ráfagas, como las despolarizaciones inducidas por el L-glutamato fueran bloqueadas en forma total (Fig. 28).

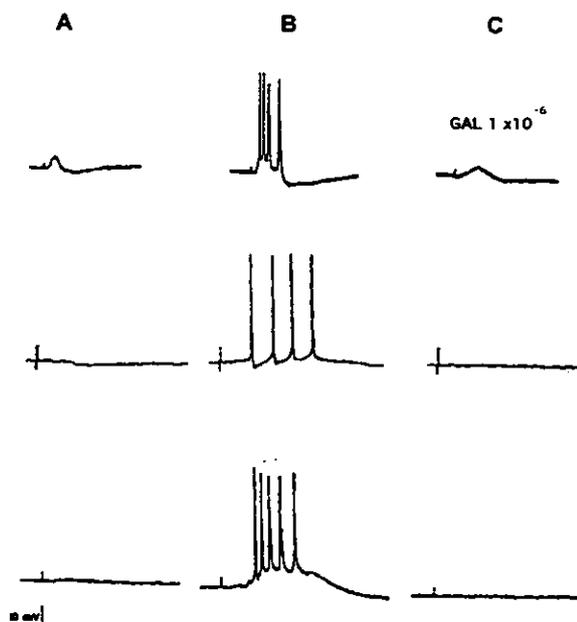


Fig. 28.

Registros que muestra registros intracelulares y los efectos excitadores inducidos con L-glutamato como la generación de descargas en ráfagas asociados con potenciales postsinápticos excitadores. En la columna "A" se observa el registro obtenido en tres diferentes células después de la aplicación de un pulso de 10 psis y 200 μseg de una solución de L-glutamato 5 μM , en presencia de 1 μM de tetrodotóxina. La columna "B" muestra el efecto del mismo pulso de L-glutamato, pero en ausencia de la tetrodotóxina. La columna "C" corresponde a registros con la misma solución de L-glutamato, en ausencia de tetrodotóxina pero, después de la adición de una solución de galphimina-B $1 \times 10^{-6} \text{M}$.

Con la finalidad de identificar el mecanismo de la excitación inducida por el L-glutamato, decidimos determinar si sus efectos son dependientes del voltaje; para ello elaboramos un protocolo de estimulación el cual llevaba el

potencial de membrana desde su valor de fijación hasta -30 y -90 mV en etapas de 10 mV (Fig. 29). Los resultados muestran que cuando el potencial de membrana se mantiene fijo en un valor entre -65 y -70 mV, los efectos de L-glutamato fueron máximos, mientras que los valores mínimos se registraron con valores de potencial de membrana cercanos a los -90 mV, es decir, cuando la neurona se hiperpolarizaba. Valores por arriba o por abajo de los -67 mV reducían los efectos excitadores del glutamato. A pesar de esta variabilidad, la adición de la G-B en concentraciones de 50-100 μM a la solución del baño reduce significativamente el efecto despolarizante de este aminoácido excitador independientemente del voltaje de la membrana.

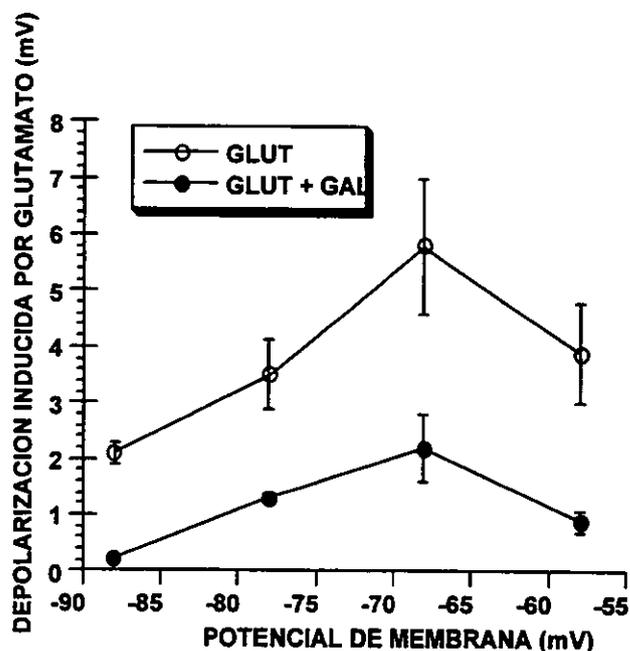


Fig. 29.

Gráfica que muestra el efecto despolarizador inducido por el L-glutamato (GLUT) con respecto al valor del potencial de membrana. El efecto más importante se registró cuando el potencial de membrana se encontraba en un valor de -67 mV. Se observa que la adición de galphimina-B (50 μM) reduce el efecto excitador en forma independiente del valor del potencial de membrana. (n=8)

La correlación de voltaje contra corriente en estas células mostró que en ausencia de fármacos, la aplicación de pulsos despolarizantes progresivos genera una corriente entrante, posiblemente de sodio (por su magnitud,

cinética y por que es bloqueada con TTX), la cual alcanza hasta los 1000 pA (círculos negros); cuando se agrega a la solución de perfusión L-glutamato en concentración de 10 μ M, la célula alcanza mayores niveles de corriente con valores menores de potencial de membrana (triángulos abiertos), es decir, hay un incremento en la conductancia del canal (Fig. 30). Cuando además de agregar el glutamato a la misma concentración se agrega una solución de G-B que contiene una concentración de 100 μ M, entonces el efecto excitador del glutamato desaparece casi totalmente (cuadrados abiertos) aunque la recuperación no sigue una dependencia de voltaje lineal, sino que, muestra irregularidades entre los -30 y -50 mV del potencial de membrana. Los resultados observados en la figura 30 provienen de los registros y análisis realizados en 15 neuronas del AVT.

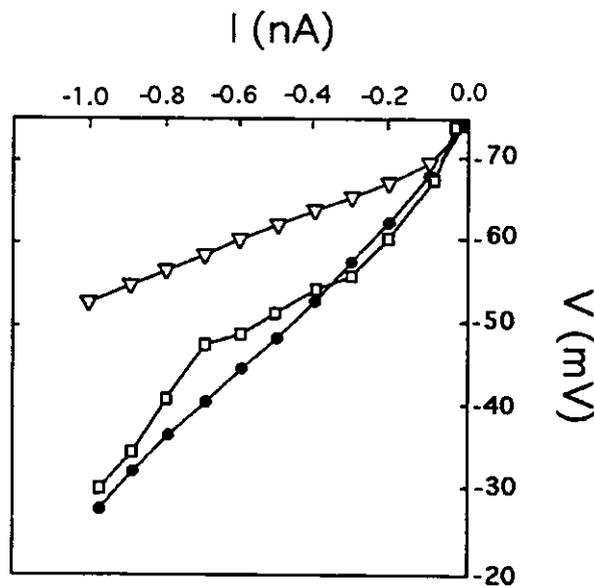


Fig. 30.

Gráfica a partir de registros intracelulares, donde se muestra la corriente generada al fijar el valor de voltaje y aplicar pulsos despolarizantes de intensidad progresiva en 10 mV, a partir de - 80 mV hasta - 30 mV. Las corrientes oscilaron entre 0 y 1000 pA: (●) control, (Δ) L-glutamato 10 μ M, (□) glutamato (10 μ M) + galphimina-B (100 μ M).

VIII. DISCUSION

En su conjunto los resultados del presente estudio muestran que las neuronas del AVT son sensibles a los efectos de la G-B.

Con base en la forma de descarga eléctrica, esta estructura se caracterizó por poseer al menos dos tipos de neuronas y sobre ambas la G-B ejerció algún efecto, así, su aplicación sistémica por vía intraperitoneal, indujo un incremento en la frecuencia de descarga en las neuronas que descargaban en ráfagas, las cuales, incidentalmente, son de índole dopaminérgico (58) y un decremento de sólo algunas de las neuronas que descargaban por espigas simples y que son de índole no dopaminérgico (59). Cuando la G-B se administró en forma local, en la inmediata vecindad de la célula en registro, se observó un efecto que también dependió del tipo de descarga que presentaba la neurona en condiciones basales; en la mayoría de las neuronas que descargaban en ráfagas, la G-B produjo una consistente depresión de su frecuencia de descarga, mientras que en algunas neuronas que descargaban en forma simple produjo un incremento. Ante la consistencia y reproducibilidad de los resultados, la discrepancia entre los efectos producidos por la administración sistémica y local de G-B se puede explicar en base a la integridad de un sistema funcional en el animal completo; la aplicación local de G-B ejerce sus efectos únicamente en las inmediaciones de la célula que se registra, mientras que, la administración i.p. involucra otras estructuras del propio sistema nervioso central que pudieran estar modulando la actividad de la neurona que se registra.

Estos resultados sugieren que el AVT quizá no sea la única zona cerebral afectada por la G-B, sino que este compuesto puede modificar también a otras estructuras que mantienen conexiones anatómicas y fisiológicas con esta región, lo cual es motivo de estudio actualmente en nuestro laboratorio.

En los registros intracelulares realizados en rebanadas de cerebro se mostró que los efectos desencadenados por la G-B son similares a los

provocados por la administración de diferentes concentraciones de GABA, aunque los efectos de la G-B en dosis equimolares siempre fueron menores tanto en amplitud como en duración. La diferencia principal entre ambos compuestos consistió en la reversibilidad de los efectos provocados por la picrotoxina y la bicuculina; estos dos fármacos revirtieron consistente y efectivamente los efectos provocados por GABA en el valor del potencial postsináptico excitador y no así aquellos inducidos por G-B, además, la adición al baño de varias concentraciones de baclofen no modificaron en forma significativa los registros, lo que sugiere la participación de receptores de GABA tipo A en las acciones de este neurotransmisor, mientras que para G-B un mecanismo de acción independiente de este tipo de receptores.

La independencia de los efectos de la G-B con respecto a las acciones de GABA se manifestó además, a través del efecto de una benzodiazepina, el clonazepam, la cual actúa sobre un receptor benzodiazepínico localizado en una subunidad del complejo GABA-receptor-ionóforo de cloro, incluido en el receptor GABA_A. En dosis equimolares los efectos de la G-B fueron de mayor intensidad, la dirección del efecto de ambos fármacos fue la misma, sin embargo, el flumazenil, un bloqueador selectivo de los receptores benzodiazepínicos de este complejo redujo en forma consistente y efectiva los efectos del clonazepam y no modificó en forma alguna las acciones de la G-B.

Aún cuando este hallazgo no excluye en forma definitiva un efecto de la G-B sobre el complejo-receptor GABA_A, ya que es posible una interacción de la G-B sobre alguna otra subunidad, por ejemplo las que se asocian a las β -carbolinas, los barbitúricos, al alcohol y otros (48), el hecho de que no exista un bloqueo por parte de la bicuculina sobre los efectos inducidos por la G-B sugiere que este compuesto no actúa a través de este tipo de receptores. Además, cuando se analizó el efecto de G-B sobre el nivel del potencial de membrana de estas células, se mostró que este compuesto es capaz de inducir un efecto hiperpolarizante significativo, lo que sugiere fuertemente una acción directa sobre la neurona que se registra, es decir, se trata de un efecto

postsináptico. Este efecto, el cual se hizo extensivo para las neuronas que responden por depolarización como en aquellas que responden por una hiperpolarización a la estimulación de campo, excluiría una acción mediada por alguna subunidad del receptor GABA_A.

La carencia de un efecto inducido por el baclofen en nuestro estudio es controversial, puesto que se mostró la presencia de receptores al GABA tipo B funcionales en esta región (60), sin embargo, se ha sugerido que este tipo de receptores parecen no estar activos durante condiciones definidas como basales (61), puesto que la administración de CGP-52432, un antagonista de estos receptores, no induce efectos detectables, a diferencia de los antagonistas de receptores GABA_A.

Cuando se analizaron las posibles interacciones entre la G-B, dopamina y el L-glutamato, se mostró que las neuronas del AVT con características electrofisiológicas típicas de neuronas dopaminérgicas, fueron inhibidas por la administración, tanto de dopamina, como de la G-B. Estas mismas neuronas fueron depolarizadas por la administración de L-glutamato. Esta sustancia constituye el neurotransmisor natural de las aferencias provenientes de la corteza cerebral frontal y del núcleo accumbens (52). En el AVT, el glutamato interactúa con receptores glutamatérgicos tanto del tipo NMDA, como del tipo no-NMDA, siendo estos últimos principalmente los receptores para el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoaxazol-4propionico (AMPA) y Kainato, localizados en las propias neuronas dopaminérgicas de la región (53). La mayor parte de los efectos desencadenados por el L-glutamato en nuestros registros fueron bloqueados por el antagonista de receptores no-NMDA, el CNQX, lo que sugiere una mayor participación de estos receptores en los efectos registrados.

En nuestro trabajo experimental, tanto en los registros extracelulares como en los intracelulares se mostró que la G-B fue capaz de bloquear las excitaciones y depolarizaciones inducidas por concentraciones que oscilaron de 1 a 10 μ M de L-glutamato; concentraciones mayores a éstas pueden

inducir efectos de inhibición por una inactivación por depolarización sostenida como ha sido descrito por algunos autores (53).

Los registros intracelulares con fijación de voltaje y aplicación de pulsos para determinar el flujo de corriente mostraron que el glutamato ejerce sus efectos en valores de voltaje que oscilaron entre -70 y -30 mV, lo cual, desde un punto de vista cinético afectaría a los canales de sodio dependientes de voltaje; estos flujos de corriente inducidos por este neurotransmisor fueron bloqueados por la G-B, lo cual sugiere un antagonismo farmacológico típico.

Se ha propuesto que las aferencias glutamatérgicas son las principales responsables de las descargas en ráfagas, características de estas neuronas dopaminérgicas. Varios estudios electrofisiológicos han mostrado que estas descargas inducen una liberación episódica de dopamina en el núcleo accumbens y la corteza prefrontal, la cual se asocia con la conducta psicópata (46). La acción terapéutica de los fármacos antipsicóticos se inicia cuando logran reducir en forma constante y sistemática la aparición de este tipo de descarga en ráfagas (58).

Numerosos estudios neuroanatómicos, neuroquímicos y electrofisiológicos muestran que las neuronas dopaminérgicas del AVT están bajo control principalmente de un sistema GABAérgico inhibitor y un sistema excitador que utiliza L-glutamato como neurotransmisor (22), además de poseer autoreceptores dopaminérgicos de tipo D_2 que regulan constantemente el nivel de descarga de estas neuronas (55). En este sentido nuestros resultados muestran que la G-B reduce la actividad de los sistemas dopaminérgicos mesencefálicos, cuya hiperactividad constituye la base de la teoría dopaminérgica de los padecimientos esquizofrénicos (13).

De manera similar a como ocurrió con la G-B, la administración aguda de compuestos con acción antipsicótica induce efectos bimodales sobre la frecuencia de descarga registrada extracelularmente (46); sin embargo, cuando se administran en forma crónica, el efecto farmacológico consecuente

es una disminución en la actividad espontánea de las neuronas dopaminérgicas (62).

La mayor parte de los fármacos antipsicóticos actúan no sólo sobre las neuronas del AVT sino que también afectan las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, por lo que uno de los principales efectos colaterales de la terapia con antipsicóticos, es la aparición de signos motores indicadores de alteraciones extrapiramidales (63).

Los mecanismos subyacentes a esta diferencia entre los efectos agudos y crónicos de los fármacos antipsicóticos son desconocidos (64), es posible que tal mecanismo dependa de los diferentes tipos de receptores dopaminérgicos localizados en estas neuronas y que muestran peculiaridades tanto de afinidad, modulación y respuesta diferentes (65). Inicialmente se mostró que los receptores dopaminérgicos mesencefálicos constituían dos tipos diferentes, uno que activaba a la adenil ciclasa (D1) y otro que la inhibía (D2), estos últimos ejercen efectos inhibidores de la excitabilidad neuronal por un mecanismo de hiperpolarización a través de la activación de proteínas G asociadas a la activación de canales rectificadores entrantes de potasio (66). Recientemente se describió la presencia de varios subtipos de receptores dopaminérgicos D₂, denominados D₃ y D₄, los cuales parecen ejercer papeles funcionales diferentes a lo largo del sistema nervioso central (67,68).

Consideramos que es indispensable analizar con mayor profundidad una posible interacción entre los receptores GABA_B y la G-B en esta estructura cerebral. La razón de tal consideración reside en el hecho de que este tipo de receptor participa en la modulación de la descarga en ráfagas y de que su actividad parece ser mediada por un mecanismo que involucra la participación de canales rectificadores entrantes de potasio (69). Similarmente, el presente estudio muestra que la G-B modula la descarga de este tipo de neuronas dopaminérgicas, reduciendo con ello la actividad en ráfagas, registros recientes en nuestro laboratorio muestran que la G-B incrementa la conductancia de un canal rectificador entrante de potasio.

Estos hallazgos son interesantes en vista del papel fisiológico que posee esta área cerebral, como es el caso de la manifestación de los efectos motivacionales de los opioides (70), de los mecanismos de reforzamiento positivo en el ingesta de alcohol y de otros fármacos de abuso (38), de la manifestación de la agresión (71), de la regulación de la actividad motora (39,35,59), de la sensibilización y tolerancia de la cocaína (36,19) y, en la conducta operante de ratas (72), entre otros.

Es posible concluir que los efectos producidos por la G-B sobre las neuronas del AVT no se realizan a través de su interacción con los receptores GABA, que su efecto difiere del que la dopamina ejerce sobre la actividad excitadora del L-glutamato y que probablemente se deben a su acción sobre los receptores glutamatérgicos de neuronas dopaminérgicas del AVT, sin conocer aun, el tipo de receptor glutamatérgico responsable, ni el mecanismo o tipo de interacción con tal receptor así como la posibilidad de hacer extensivos estos resultados a otro tipo de neuronas ó a neuronas dopaminérgicas localizadas en otras estructuras.

IX. REFERENCIAS

1. Soria-Rocha, G. Flora de Morelos. Universidad Autonoma del Estado de Morelos. Serie: ciencias naturales y de la salud. Ed. La Fuente Impresores, México. pp. 107-110 (1985).
2. Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México Ed. Andres Botas, México. 5ª Edición, pp. 402-403 (1969)
3. Rzedowski, J., Equihua, M. Atlas Cultural de México (Flora). Ed. Planeta, México. 1ª Edición, pp. 57 (1987).
4. Bailey, L.H. Manual of Cultivated Plants Ed. Macmillan Publishing, N.Y. 16ª impresión, pp. 614 (1977).
5. Nakanishi, K., Sasaki, S., Kiang, A.K., Goh, J., Kakisawa, H., Ohashi, M., Goto, M., Watanabe, J., Yokotani, H., Matsumura, Ch., Togashi, M. Phytochemical survey of malaysian plants preliminary chemical and pharmacological screening. Chem. Pharm. Bull. 13: 882-890 (1965).
6. Griffiths, L.A. On the distribution of Genticic Acid in green plants. J. Exp. Botany 10: 437-442 (1959).
7. Estrada, E. Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Fitotécnia. pp. 15 (1985).
8. Tortoriello, J. and Lozoya, X. Effect of *Galphimia glauca* methanolic extract on neuropharmacological tests. Planta Med. 58: 234-236 (1992).
9. Toscano, R.A., Ortega, A., Maldonado, E., Gaviño, R., Lozaoya, X., Tortoriello, J. Structure of Galphimine B, Acta Cryst., C49: 774-776 (1993).
10. Tortoriello, J. and Ortega, A., Sedative effect of galphimine-B, a nor-seco-triterpenoid from *Galphimia glauca*. Planta Med. 59: 398-400 (1993).
11. DiChiara, G., The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. Drug Alcohol. Dep. 38: 95-137 (1995).
12. Robinson, T.E. and Berridge, K.C. the neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. Brain Res. Rev. 18: 247-291 (1993).
13. Ellison, G., Stimulant-induced psychosis, the dopamine theory of schizophrenia, and the habenula. Brain Res. Brain Res. Rev. 19: 223-239 (1994).
14. Kosobud, A.E., Harris, G.C. and Chapin, J.K., Behavioral associations of neuronal activity in the ventral tegmental area of the rat. J. Neurosci. 14: 7117-7129 (1994).

15. Björklund, A. and Lindvall, O. Dopaminergic containing systems in the CNS. In: Handbook of Chemical Neuroanatomy (Björklund, A., Hökfelt, T, eds.) pp 55-122, volume 2, Classical transmitters in the CNS, Part. I. (1984).
16. Dahlström, A. and Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 6₂, Suppl. 232, I. (1965).
17. Ungherstedt, U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* (Suppl) 367: 1-48 (1971)
18. Berger, B., Gaspar, P. and Verney, C. Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. *TINS* 14: 21-27 (1991).
19. Kalivas, P.W. and Duffy, P., Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. II. Dopamine perikarya, *J. Neurosci.* 13: 276-284 (1993).
20. Llinas, R., Greenfield, S.A. and Jahnsen, H. Electrophysiology of pars compacta cells in the *in vivo* substantia nigra, a possible mechanism for dendritic release. *Brain Res.* 294: 127-132 (1984).
21. Martin, L.P. and Waszczak, B. D1 agonists-induced excitation of substantia nigra pars reticulata neurons: mediation by D1 receptors on striatonigral terminalis via a pertussis toxin-sensitive coupling pathways. *Neurosci.* 14: 4494-4506 (1994).
22. Kalivas, P.W., Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 18: 75-113 (1993).
23. Johnson, S.W., and North, A. Opioids excite dopamine neurons by hiperpolarization of local interneurons. *J. Neurosci.* 12: 483-488 (1992).
24. Nauta, W.J.H., Smith, G.P. Faull, R.L.M. and Domesick, V.B. Efferent connections of nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neurosci.* 3: 385-401 (1978).
25. Heimer, L., Zahn, D.C., Churchill, L., Kalivas, P.W. and Wholtmann, C. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neurosci.* 41: 89-125 (1991).
26. Sesack, S.R. and Pickel, V.M., Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.* 320: 145-160 (1992).
27. Gould, E., Woolf, N.J, and Butcher, J.J. Cholinergic projections to the substantia nigra and VTA from the peduncolopontine and laterodorsal tegmental nuclei. *Neurosci.* 28: 611-624 (1989).
28. Hervé, D., Pickel, V.M., Joh, T.H. and Beaudet, A. Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: Fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons. *Brain Res.* 435: 71-83 (1987).

29. Oades, R.D. and Halliday, G.M. Ventral tegmental (A10) system: Neurobiology I, anatomy and connectivity. *Brain Res. Rev.* 12: 117-165 (1987).
30. DiChiara, G., Morelli, M. and Consolo, S. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ach/dopamine/NMDA interactions. *TINS* 17: 228-238 (1994).
31. Kitai, S.T. and Surmeier, D.J. Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv. Neurol.* 60: 40-52 (1993).
32. Maura, G., Gardi, L. And Raiteri, M. Release-regulating D₂ dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 680-684 (1988).
33. Grant, S. and Fitton, A., Risperidone. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the treatment of schizophrenia. *Drugs.* 48: 253-273 (1994).
34. Schumacher, H.E., Oehler, J. and Jaehkel, M., Individual motor activity relationships to dopaminergic responses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48: 839-844 (1994).
35. Tucci, S., Fernandez, R., Baptista, T., Murzi, E. and Hernandez, L., Dopamine increase in the prefrontal cortex correlates with reversal of haloperidol-induced catalepsy in rats. *Brain Res. Bull.* 35: 125-133 (1994).
36. Hammer, R.P.,Jr. and Cooke, E.S., Gradual tolerance of metabolic activity is produced in mesolimbic regions by chronic cocaine treatment, while subsequent cocaine challenge activates extrapyramidal regions of rat brain. *J. Neurosci.* 14: 4289-4298 (1994).
37. Henry, D.J., Wise, R.A., Rompre, P.P. and White, F.J., Acute depolarization block of A10 dopamine neurons: interactions of morphine with dopamine antagonists. *Brain Res.* 596: 231-237 (1992).
38. McBride, W.J., Murphy, J.M., Gatto, G.J., Levy, A.D., Lumeng, L. Serotonin and dopamine systems regulating alcohol intake. *Alcohol. Alcohol. Suppl.* 1: 411-416 (1991).
39. Perugini, M. and Vezina, P., Amphetamine administered to the ventral tegmental area sensitizes rats to the locomotor effects of nucleus accumbens amphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 690-696 (1994).
40. DiChiara, G. And Imperato, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5274-5278 (1988).
41. Wise, R.A., and Bozarth, M.A., A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol. Rev.* 94: 469-492 (1987).

42. Rossetti, Z.L., Hmaidan, Y., and Gessa, G.L., Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 221: 227-234 (1992).
43. Skarsfeldt, T., Comparison of short-term administration of sertindole, clozapine and haloperidol on the inactivation of midbrain dopamine neurons in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 254: 291-294 (1994).
44. Grant, S.J. and Sonti, G., Buprenorphine and morphine produce equivalent increases in extracellular single unit activity of dopamine neurons in the ventral tegmental area *in vivo*, *Synapse* 16: 181-187 (1994).
45. Sakharov, D., Voronezhskaya, E. and Nezhlin, L., Chronic haloperidol: neural correlates of motor disorders in an invertebrate model. *Neuroreport.* 5: 667-670 (1994).
46. Sunahara, R.K., Seeman, P., Van Tol, H.H. and Niznik, H.B., Dopamine receptors and antipsychotic drug response, *Br. J. Psychiatry Suppl.*, 31-38 (1993).
47. Grace, A.A., Bunnery, B.S., Moore H. And Todd, C.L. Dopamine-cell depolarization block as a model for the therapeutic actions of antipsychotic drugs. *TINS* 20: 31-37 (1997).
48. Mayer, M.L. and Westbrook, G.L. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 28: 197-276 (1987).
49. Wang, T. and French, E.D. Electrophysiological evidence for the existence of NMDA and non-NMDA receptors on rat ventral tegmental dopamine neurons. *Synapse* 13: 270-277 (1993).
50. Calabresi, P., Pisani, A., Mercury, N.B. and Bernardi, G. Long-term potentiation in the striatum is unmasked by removing the voltage-dependent magnesium block of NMDA receptor channels. *Eur. J. Neurosci.* 4: 929-935 (1992).
51. Wyss, J.M. and Sripanidkulchai, K. The topography of mesencephalic and thalamic projections from the cingulate cortex of the rat. *Brain Res.* 293(184) 1-15.
52. Christie, M.J., Bridge, S., James, L.B. and Beart, P.M. Excitotoxic lesions suggest an aspartatergic projection from rat medial prefrontal cortex to ventral tegmental area. *Brain Res.* 333: 169-172 (1985).
53. Seutin, V., Verbanck, P., Massotte, L. and Dresse, A. Evidence for the presence of N-methyl,D-aspartate receptors in the ventral tegmental area of the rat. An electrophysiological *in vitro* study. *Brain Res.* 514: 147-150 (1990).
54. Kalivas, P.W., Duffy, P. and Barrow, J. Regulation of the mesocorticolimbic dopamine system by glutamic acid receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251 378-387 (1989).
55. Carlsson, A. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacol.* 1: 179-186 (1988).

56. Tortoriello, J., Reyes-Vázquez C., Ortega A. Pharmacological study of sedative properties of galphimine-B on central nervous system. *Arch. Med.Res.* 24:92 (1993).
57. Pellegrino, L.J., Pellegrino, A.S. and Cushman, A.J. *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*. Plenum Press, Segunda edición. Pag. 45-48 (1979).
58. Bowery, B., Rothwell, L.A. and Seabrook, G.R. Comparison between the pharmacology of dopamine receptors mediating the inhibition of cell firing in rat brain slices through the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *Br. J. Pharmacol.* 112: 873-880 (1994).
59. Vezina, P., Herve, D., Glowinski, J. and Tassin, J.P., Injections of 6-hydroxydopamine into the ventral tegmental area destroy mesolimbic dopamine neurons but spare the locomotor activating effects of nicotine in the rat. *Neurosci. Lett.* 168: 111-114 (1994).
60. Bayer, V.E., Pickel, V.M. GABA-labeled terminals from proportionally more synapses with dopaminergic neurons having low densities of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in rat ventral tegmental area. *Brain Res.* 559: 44-55 (1991).
61. Westernik, B.H.C, Kwint, H.F., deVries, J.B. The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain. *J. Neurosci.* 16: 2605-2611 (1996).
62. Skarsfeldt, T. Differential effects of repeated administration of novel antipsychotic drugs on the activity of midbrain dopamine neurons in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 281: 289-294 (1995).
63. Bowery, B.J., Rothwell, L.A., Seabrook, G.R. Comparison between the pharmacology of dopamine receptors mediating the inhibition of cell firing in rat brain slices through the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area *Br. J. Pharmacol.* 112: 873-880 (1994).
64. Skarsfeldt, T. Differential effects of repeated administration of novel antipsychotic drugs on the activity of midbrain dopamine neurons in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 281: 289-294 (1995).
65. Bowery, B.J., Razzaque, Z., Emms, F., Freedman, L., Bristow, L., Kulagowski J., Seabrook, G.R. Antagonism of the effects of (+)-PD 128907 on midbrain dopamine neurones in rat brain slices by a selective D2 receptor antagonist L-741,626. *Brit. J. Pharmacol.* 119: 1491-1497 (1996).
66. Bowery, B.J., Rothwell, L.A., Seabrook, G.R. Comparison between the pharmacology of dopamine receptors mediating the inhibition of cell firing in rat brain slices through the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area *Br. J. Pharmacol.* 112: 873-880 (1994).
67. Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M-P., Bouthenet, M-L, Schwartz, J-C. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature* 347: 146-151 (1990).

68. Van Tol, H.H.M., Bunzow, J. R., Guan, H-C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Niznik, H.B., Civelli, O. : Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic colzapine. *Nature* 350: 610-614 (1991).
69. Overton, P.G., Clark, D. Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res. Rev.* 25: 312-334 (1997).
70. Bals-Kubik, R., Ableimer, A., Herz, A. and Shippenberg, T.S., Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 489-495 (1993).
71. Roeling, T.A., Veening, J.G., Kruk, M.R., Peters, J.P., and Nieuwenhuys, R., Efferent connections of the hypothalamic "aggression area" in the rat, *Neuroscience.* 59: 1001-1024 (1994).
72. Skutella, T., Probst, J.C., Jirikowski, G.F., Holsboer, F. and Spanagel, R., Ventral tegmental area (VTA) injections of tyrosine hydroxylase phosphorothioate antisense oligonucleotide suppress operant behavior in rats. *Neurosci. Lett.* 167: 55-58 (1994).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**