

003876



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

"INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS
ENTRE LA GÁLFIMINA-B Y LOS SISTEMAS
GABAÉRGICOS Y GLUTAMATÉRGICOS
DEL ÁREA VENTRAL TEGMENTAL".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A:

M. EN C. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. CRUZ REYES VAZQUEZ

MEXICO. D. F.

ENERO DEL 2003

A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de octubre de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) Maribel Lucila Herrera Ruiz, con número de cuenta 85289198 y número de expediente 12952009, con la tesis titulada: "Interacciones farmacológicas entre la Galfimina-B y los sistemas Gabaérgicos y Glutamatergicos del área ventral tegmental", bajo la dirección del (la) Dr. Cruz Reyes Vázquez.

Presidente:	Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin
Vocal:	Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
Vocal:	Dr. Jaime Tortoriello García
Vocal:	Dr. Stefan Lucien Mihailescu
Secretario:	Dr. Cruz Reyes Vázquez
Suplente:	Dra. María Esther Cruz Beltrán
Suplente:	Dra. María Teresa Benitez Rodríguez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de noviembre de 2002


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

3

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo brindado a través de las becas de doctorado al proyecto IN-215700 por la Dirección General del Personal Académico de la UNAM. Así como por el donativo otorgado por la Coordinación de Investigación en Salud al proyecto FP-0038-708 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Agradezco a mi comité tutorial:

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dr. Cruz Reyes Vázquez.

Por el apoyo brindado a lo largo de todos mis estudios de Doctorado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

Índice.

Marco de referencia.....	2
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Antecedentes	
<i>Galphimia glauca</i>	6
Aspectos fitoquímicos de <i>Galphimia glauca</i>	8
Aspectos farmacológicos de <i>Galphimia glauca</i>	9
Area Ventral Tegmental.....	10
Planteamiento del problema.....	20
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	22
Metodología	
Obtención del material vegetal.....	23
Rebanadas de AVT en rata.....	23
Registros electrofisiológicos.....	27
Resultados.....	34
Discusión.....	48
Conclusiones.....	56
Referencias.....	57

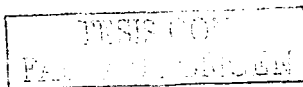
TESTIS CON
FALLA DE ORIGEN

Marco de Referencia.

El reino vegetal ha sido y es fuente de múltiples compuestos utilizados en muchos campos del quehacer humano. Quizá una de las utilidades más apreciada de los compuestos derivados de vegetales, es su aplicación terapéutica, no es exagerado decir que la gran mayoría de los fármacos que actualmente se utilizan dentro de la terapéutica médica provienen o son productos naturales. Tampoco resultaría excesivo mencionar que el porcentaje de especies vegetales útiles, que se ha estudiado es mínimo. Lo que indica la enorme faena a realizar dentro de este campo de la investigación biológica.

Contrariamente a lo que la mayor parte de la gente supone, el obtener un producto natural como un fármaco disponible para su uso terapéutico, comprende una tarea de enormes proporciones. Inicialmente es necesario analizar el conocimiento empírico que un conjunto de individuos posee sobre una determinada planta. De entrada, esto resulta complicado, porque usualmente dos poblaciones de individuos puede emplearla para diferentes padecimientos, por lo que resulta de primordial importancia el identificar adecuadamente la planta. La biodiversidad y variabilidad geográfica, climática y temporal, son otros factores a tomar en cuenta. La composición de las plantas puede variar en función del área geográfica en la que se encuentren, del clima y de la época del año. Por lo que resulta importante investigar estos factores fundamentalmente con el grupo de personas que tradicionalmente han empleado la planta.

La investigación del laboratorio, primero se centra en la búsqueda del o de los compuestos activos. Es necesario identificar el sitio de la planta donde existen tales compuestos; así, mediante estudios de fragmentación de la planta y la producción de extractos con varios tipos de disolventes, se inicia el cernimiento farmacológico, el cual fundamentalmente se realiza en modelos animales. Paralelamente a los estudios de bioefectividad, se realizan pruebas



toxicológicas, tendientes a describir los diferentes parámetros farmacológicos que describen su posible utilidad terapéutica. Como puede observarse este perfil es muy similar a los empleados por la industria farmacéutica para validar cualquier compuesto con ese potencial. Tal procedimiento requiere de un importante número de años y de recursos económicos considerables. Por lo que el colocar en el estante de la farmacia un producto natural, constituye una inversión de mucho dinero.

Todo este proceso se esta realizando en el caso de la galfimina-B. En el Centro de Investigación Biomédica del Sur perteneciente al IMSS, se ha estudiado este compuesto desde su inicio, lo cual ha representado una inversión importante de recursos materiales y humanos. Afortunadamente, también ha fomentado la colaboración entre varios centros de investigación lo que ha redundado en un amplio beneficio para las instituciones participantes.

Actualmente nuestro proyecto se encuentra ya en una fase que correspondería a la fase I de estudios biológicos en el quehacer farmacológico. Después de aislar el compuesto se han realizado estudios de cernimiento donde se le han descrito sus potenciales terapéuticos. Posterior a ello, estamos determinando los mecanismos de acción que este producto emplea para realizar tales efectos. Este estudio por ejemplo, nos muestra que los efectos depresores de la actividad cerebral que este compuesto ejerce, son consecuencia de una interacción directa con neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. La descripción de tal mecanismo nos permitirá además proponer algunos otros posibles efectos sobre otras funciones que estas estructuras ejercen. Este trabajo es un eslabón más dentro de la secuencia de estudios que nos permitirán obtener un compuesto útil en el arsenal terapéutico existente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen.

La galfimina-B (G-B, 13 α -Carbometoxi-4R-7 α , 18 β -tri-hidroxi-30-nor-3,4 seco-fridela-1, 20-diene 3, 24-olide (C₃₀H₄₄O₇)) es un compuesto bioactivo aislado de la planta *Gulphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae) con propiedades depresoras del sistema nervioso central. Estudios previamente reportados mostraron que tanto la aplicación sistémica como local de este compuesto modifica significativamente la generación de espigas espontáneas en las neuronas del Área Ventral Tegmental mesencefálica (AVT). En el presente estudio analizamos los efectos de dicho compuesto sobre las sinápsis glutamatérgicas de las neuronas dopaminérgicas identificadas electrofisiológicamente en dicha zona. Los registros se realizaron en rebanadas de cerebro que contenían al Área Ventral Tegmental, con el empleo de técnicas de registro intracelular y de patch-clamp en su modalidad de célula integra. Todos los registros se efectuaron en neuronas dopaminérgicas identificadas con al menos tres criterios electrofisiológicos característicos. Inicialmente, se registraron las corrientes espontáneas postsinápticas excitadoras miniatura y posteriormente las corrientes postsinápticas excitadoras y los potenciales postsinápticos inhibidores inducidos por la estimulación de campo (0.03 ms, 10-25 mV, y 0.1-0.3 Hz), los cuales fueron registrados en presencia de bicuculina (10 μ M) y saclofen (200 μ M), fármacos que bloqueaban la transmisión GABAérgica tanto de tipo GABA_A como GABA_B, respectivamente. Los registros se realizaron en situación control y después de infusiones en el baño de varias concentraciones de G-B (1 μ M- 5mM), GABA (1 nM- 100 μ M), de bloqueadores GABA_A como la picrotoxina (100 μ M) y bicuculina (10 μ M), además del bloqueador GABA_B como el saclofen (200 μ M). A diferencia del GABA que afectó tanto la amplitud como la frecuencia de las corrientes postsinápticas miniatura, la aplicación de G-B redujo sólo la frecuencia y no la amplitud de estas señales eléctricas, lo que sugiere un efecto presináptico. Además, tanto la infusión de GABA (IC₅₀ = 645nM) como de galfimina-B (IC₅₀ = 175.4 μ M) provocaron una reducción significativa de la amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras glutamatérgicas. Sin embargo, tanto la cinética como la intensidad del efecto fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$). Adicionalmente, la bicuculina bloqueó las acciones depresoras del GABA pero no mostró efecto alguno sobre las acciones ejercidas por la G-B. Finalmente, en el registro de los potenciales postsinápticos inhibidores-GABAérgicos se observó la participación de receptores GABA_A, ya que éstos fueron significativamente modificados por la adición de picrotoxina, pero no por la presencia de galfimina-B. Estos datos indican que este producto natural tiene la capacidad de modificar la actividad de las neuronas dopaminérgicas del Área Ventral Tegmental por un mecanismo diferente al GABAérgico.

TESIS CON
FALLA DE OBRAS

Abstract.

Galphimine-B (G-B) is a bioactive compound isolated from the plant *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae) with central nervous system depressant properties previously described. In an earlier study, it was shown that both, systemic and local application of G-B modified the extracellular spontaneous spiking activity of Ventral Tegmental Area (VTA) neurons. In the present study the synaptic effects of this compound on dopaminergic electrophysiologically-identified neurons were analyzed. Recordings were made in brain slices using both intracellular and patch-clamp techniques, in electrophysiological characterized dopaminergic Ventral Tegmental area neurons, Spontaneous miniature Excitatory Postsynaptic Currents and Excitatory Postsynaptic Currents and Inhibitory Postsynaptic Potentials induced by field stimulation (0.03 ms, 10-25 mV, and 0.1-0.3 Hz), were recorded in control situation and after bath infusions of several concentrations of galphimine-B (1 μ M-5mM), GABA (1 nM-100 μ M) and the GABA_A blockers picrotoxin (100 μ M) and bicuculline (10 μ M) and GABA_B blocker saclofen (200 μ M). Galphimine-B administration reduced the frequency ($p < 0,05$) but had not effect on amplitude of mESPCs, while GABA ($IC_{50} = 645$ nM) and Galphimine-B ($IC_{50} = 174.5$ μ M) infusion reduced significantly the amplitude of stimuli induced EPSCs, however, bicuculline (10 μ M) co-administration reduced only GABA effects and elicited no action on galphimine-B depressant actions. Finally, isolated GABAergic IPSPs were modified by the addition of picrotoxin (100 μ M), but G-B (100 μ M) had no effect on these evoked synaptic responses. The present results indicate that galphimine-B modifies synaptic activity on dopaminergic Ventral Tegmental Area neurons by a non-GABAergic mechanism.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

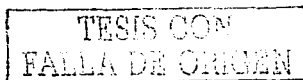
Antecedentes.

Galphimia glauca.

La galfimina-B (G-B) es un compuesto proveniente de la *Galphimia glauca* Cav., que es una especie vegetal mexicana que pertenece a la familia de las *Malpighiaceae*, alcanza de 2 a 4 metros de altura y florece todo el año (Fig. 1). Sus inflorescencias ocurren son tipo panículas, con pedicelos anchos de pocas flores, con el tiempo sus sépalos son oblongos o lanceolados de 3.5 mm de largo, con corola amarilla formada por pétalos de 12mm. Su fruto tiene forma de una cápsula de 4 mm de largo de cara roja escarlata, con rugosidades. La planta tiene una distribución en altitudes que van desde 0 a 2350 metros sobre el nivel del mar; por lo tanto crece en los estados de Guerrero, Michoacán, San Luis Potosí, Morelos, Chiapas y Sonora en lugares de vegetación perturbada, pastizales, matorrales y bosques. En lengua Nahuatl a esta planta *Galphimia glauca* se le denomina "Totoncapatli" que proviene de Totonqui= Caliente y Patli= Medicina. Se le asignan diferentes nombres populares, dependiendo del estado, por ejemplo en Guerrero se conoce como "Corpionchi", en Michoacan como "Huachata", "Nacachata", "Vacachata", "Calderona" o "Flor de Diciembre", en Jalisco es nombrada como "Ramo de Oro", en San Luis Potosí "Hierba del piojo" Guanajuato, "Hierba del Cuervo"; en Morelos, "Xaxaxaoti" y en Chiapas, "Flor de Chinche".

Los datos en la literatura acerca del uso que en la medicina tradicional mexicana se hace de *Galphimia glauca*, no son muy amplios. Sin embargo, hay información desde el siglo XVI, época en la que se administraba la planta para curar "los fríos de las fiebres intermitentes y fortalecer a las parturientas", controlar diarreas, quitar el empacho y curar las disenterías (16).

También, se reporta que el cocimiento de las hojas de este arbusto era recomendado como emoliente y para curar heridas, en el estado de Morelos se



preparaba un cocimiento de la planta, le agregaban otras plantas como la "sanguinaria" (*Hypericum partense*) y era usado por mujeres embarazadas que padecían del mal llamado "flores blancas".

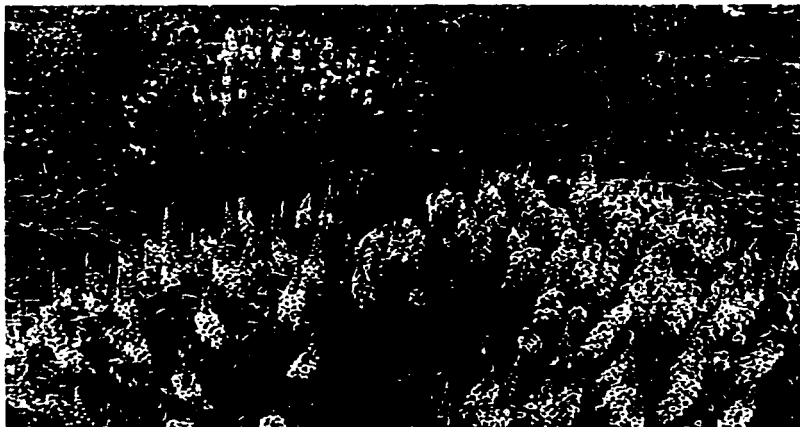


Fig. 1. *Galphimia glauca* Cav., planta de cuyas flores se obtiene la Galfimina-B. Ejemplar fotografiado en Guanajuato México.

Aun cuando son pocos los datos que hacen referencia a su posible uso sobre padecimientos del SNC, se menciona que en algunos sitios de la República Mexicana es utilizada porque es capaz de "calmar a los locos", otro dato importante es que las infusiones preparadas con las hojas y tallos de la planta ayudaban a tranquilizar y a disminuir las diarreas nerviosas de los soldados durante la Guerra Cristera en México. Sin embargo, sólo hay un dato documentado que manifiesta que la medicina tradicional hace uso de *Galphimia glauca* como sedante (16).

Aspectos Fitoquímicos de *Galphimia glauca*.

Con base en técnicas cromatográficas, espectrofotométricas, de resonancia magnética nuclear, de carbono 13 y difracción de rayos X a la par de un análisis biodirigido, se logró aislar e identificar un compuesto activo de la planta al cual se le dio el nombre de Galfimina-B (G-B). En función de su composición química, esta sustancia tiene como nombre químico: 13 α -carbometoxi-4R-7 α , 18 β -tri-hidroxi-30-nor-3,4 seco-fridela-1, 20-diens 3, 24-olide (C₃₀H₄₄O₇) (Fig. 2) (74).

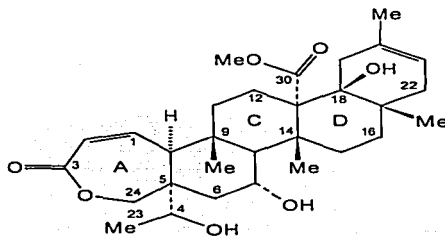


Fig. 2. Estructura química de la Galfimina-B un 13 α -Carbometoxi-4R-7 α , 18 β -tri-hidroxi-30-nor-3,4 seco-fridela-1, 20-diens 3, 24-olide.

Además de la G-B, se caracterizaron otros compuestos de la misma planta, como son: galfimina A, C, D y E, las cuales también poseen una estructura tipo nor-seco triterpénica; y la glucamina, que posee una estructura seco-triterpénica (8). En 1992 se reportó el aislamiento del ácido gálico, metil galato, quercetina y ácido tetragaloilquinico (14). Müller, A. y cols. describen la presencia de flavonoides acilglucosilados en *Galphimia glauca*, estos son: quercetina-3-O-(2"-galloyl)- β -D-glucosido, quercetina-3-O-(6"-galloyl)- β -D-glucosido, 2",4"- Dicouma-roylastragalin y tiliroside entre otros (46).

Aspectos Farmacológicos de *Galphimia glauca*.

Varios estudios muestran que los extractos de *Galphimia glauca* ejercen importantes propiedades farmacológicas, entre las que destacan su actividad sobre músculo liso (72), y sobre la liberación de histamina en mastocitos adenoidales (46). Además, se describió que los compuestos flavonoides antes mencionados disminuyen la hemólisis inducida por las proteínas del complemento durante la coagulación (46). Algunos compuestos de la planta aislados por Dorsch, muestran actividades antiasmáticas. Un estudio reciente, se observó que los extractos obtenidos con etilacetato antagonizaron los efectos broncoconstrictores del leucotrieno D₄, de una forma muy similar a como lo hace otro tipo de compuestos antiasmáticos (9).

También la administración sistémica de un extracto metanólico de las partes aéreas de *Galphimia glauca* provocaron una potenciación del efecto hipnótico inducido por barbitúricos, en ratones. Además de un efecto de protección contra convulsiones inducidas por la estricnina, un bloqueador del ionóforo de cloro-GABA_A cerebral (72).

La G-B, uno de los compuestos derivados de esta planta y que hasta ahora es considerado como el de mayor relevancia biológica, muestra ejercer efectos significativos sobre la actividad del SNC. Por ejemplo, es capaz de incrementar el tiempo de narcosis inducida por pentobarbital en una forma dependiente de la dosis, además de producir inhibición de la contracción inducida por estimulación eléctrica del ileon aislado de cobayo por una acción sobre el sistema nervioso entérico (72). En un intento de analizar tanto el mecanismo de acción como el sitio cerebral donde estos efectos se llevan a cabo, se realizó un estudio encaminado a localizar las regiones cerebrales que mostraran los cambios electrofisiológicos más representativos por la administración de este compuesto (73). El resultado de este estudio identificó al área ventral tegmental mesencefálica (AVT) de ratas como un sitio altamente

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

sensible a los efectos de la galfimina-B. La administración intraperitoneal de dicho compuesto (1mg/kg) provocó efectos excitadores en neuronas del AVT que muestran una actividad de disparo en ráfagas y respuestas tanto excitadoras como inhibitorias sobre las células que disparan en descargas simples. Aún cuando los resultados de esta aplicación intraperitoneal indican que las neuronas que respondieron son sensibles a la G-B, no fue posible determinar si el efecto de este compuesto es directo sobre las neuronas que se registraron. Para responder a esta cuestión se realizó la administración del compuesto en forma local, por microiontoforesis, una técnica que permite aplicar el fármaco en la inmediata vecindad de la célula que se registra. Los resultados de este estudio mostraron que la mayoría de las neuronas (78%) redujeron su frecuencia de descarga, mientras que sólo un porcentaje menor (5%) mostró un incremento en dicha actividad (73).

Área Ventral Tegmental.

El área ventral tegmental (AVT), esta formada por un grupo heterogéneo de células localizadas en el piso del mesencéfalo, las cuales se extienden rostralmente hacia los cuerpos mamilares y al hipotálamo posterior (estructuras diencefálicas). En la parte dorsal del AVT existen fibras provenientes de los núcleos del tallo cerebral, lo que conforma el haz prosencéfalico anterior ensanchándose conforme asciende desde el cerebro medio hasta telencéfalo, principalmente a la parte más rostral y superior del cerebro. El AVT se localiza fundamentalmente en la porción medial de la línea media en forma bilateral; posee una apariencia semicircular en un corte transversal, mientras que en su extensión caudal está en la proximidad del núcleo interpenduncularis. Un rasgo distintivo de esta estructura es su localización lateral a la sustancia nigra (SN) pars compacta, con la que comparte muchos rasgos anatómicos citológicos y funcionales (51) (Fig. 3).

TESIS CON
FALLA DE CENSURAS

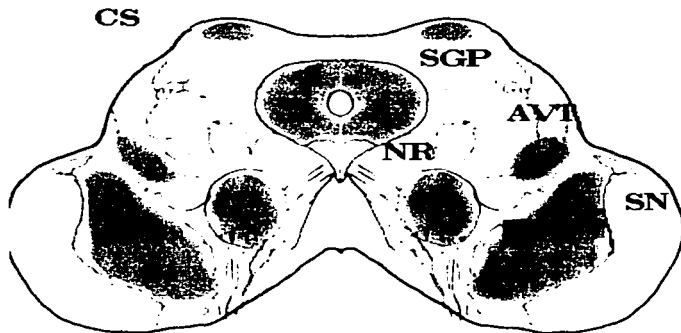


Fig. 3. Corte transversal mesencefálico que muestra la localización de la región del área ventral tegmental (AVT), se observan además, los colículos superiores (CS), la sustancia gris periacueductal (SGP), el núcleo rojo (NR) y la sustancia negra (SN).

Dahlström y Fuxe en 1964 (12), determinaron que el AVT contiene aproximadamente el 80% de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, a las cuales les asignaron, dentro de la clasificación aminérgica del cerebro, el grupo A10. En la inmediata vecindad del AVT se localiza además, a la sustancia nigra, la cual se divide en pars compacta (SNpc) y en la pars reticulada (SNpr) esta última, conformada principalmente por interneuronas GABAérgicas. Las neuronas de origen dopaminérgico de las SNpc son agrupadas, de acuerdo con Dahlstrom y Fuxe en la región A9. Estos autores también mostraron que el AVT o región A10, contiene entre otras neuronas, a los cuerpos neuronales dopaminérgicos cuyas proyecciones dan origen al sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (12).

Éste, proyecta hacia áreas motoras y límbicas del encéfalo, como lo son, las cortezas frontal, prefrontal, cingulada y entorrinal, la amígdala, el septum

lateral, el tubérculo olfatorio, el estriado, el núcleo accumbens (Nac), el hipocampo y el núcleo habenular lateral (30).

Además de las vías dopaminérgicas mesocorticolímbicas descritas, otras neuronas mesencefálicas dopaminérgicas localizadas preferencialmente en la sustancia nigra pars compacta, dan origen a la vía nigroestriatal. Esta vía inerva al estriado dorsal (caudado-putamen), y su degeneración da origen a la enfermedad de Parkinson.

Las funciones cerebrales que son moduladas por los sistemas dopaminérgicos son múltiples y dependen de cual sea el circuito neuronal que este siendo modulado por dopamina. Por ejemplo, los sistemas nigroestriales juegan un papel decisivo en el control del movimiento y del tono muscular, mientras que los sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbicos son fundamentales en el estado de ánimo, en los mecanismos cognoscitivos, en el reforzamiento positivo y negativo en respuesta a fármacos y conductas emocionales y sexuales. Por otro lado, los sistemas dopaminérgicos del hipotálamo son fundamentales en la regulación de la conducta sexual, la secreción de hormonas sexuales y de la ingesta de alimento. El mal funcionamiento de estos sistemas da como consecuencia algunas condiciones patológicas bien definidas como la enfermedad de Parkinson (61), o algunas en las cuales el mecanismo de la patología no es aún muy claro como la esquizofrenia y algunas psicosis (41).

Los efectos que ejercen estos sistemas dopaminérgicos están mediados por acción de la dopamina, la cual actúa sobre sus diferentes receptores (rD). Actualmente, se han caracterizado 5 diferentes receptores, los cuales ha sido subdivididos en 2 familias o clases, la clase D₁ que incluye a los receptores D₁ y D₅ y la clase D₂ que corresponde a los receptores D₂, D₃, y D₄. Ambas clases pueden diferenciarse por sus propiedades fisiológicas, farmacológicas, bioquímicas y por su distribución en el organismo (44). Los receptores a dopamina pertenecen a la familia de receptores con siete dominios

transmembranales que están acoplados a proteínas G. Los receptores clase D₁ comparten una alta homología de sus dominios transmembranales y en sus características de unión, la cual cuando se lleva a cabo induce la activación de una proteína G_s (52) y como consecuencia, la estimulación de la adenilato ciclasa (AC) (15). Por su parte, los receptores clase D₂ poseen una alta afinidad de unión a ligandos específicos y poseen entre sí, gran homología en sus dominios transmembranales. Su asociación a la dopamina provoca una inhibición de la AC, consecuencia de la activación de una proteína G_i (10).

Los niveles más altos de receptores clase D₂ se localizan en el estriado, NAc y tubérculo olfatorio, aunque también están ampliamente distribuidos en células dopaminérgicas de la SNPc y en menor extensión en la SNpr, el AVT y en las células magnocelulares del núcleo rojo que forman parte de la vía rubroespinal. Esto implica que la mayor cantidad de receptores clase D₂ se encuentran localizados principalmente en células dopaminérgicas y sólo existe un porcentaje muy bajo localizado en células diferentes a éstas; además, se mostró que estos receptores se encuentran modulando la liberación de dopamina y como consecuencia la excitabilidad de dichas neuronas, razón por la cual estos receptores son denominados "autorreceptores" (62).

Una situación diferente ocurre con respecto a los receptores clase D₁, éstos no se localizan en forma significativa en zonas mesencefálicas dopaminérgicas (1), su localización ha sido repetidamente encontrada sobre todo en las regiones sinápticas de las terminales estriatonigrales; lo que le confiere una actividad sobre todo de tipo postsináptica, modulando la excitabilidad de las neuronas en las que la dopamina constituye una de las señales aferentes a las mismas. Los niveles más elevados de esta clase de receptor dopaminérgico se encuentran en el estriado, el NAc y el tubérculo olfatorio. La principal función de esta clase de receptores consiste en transmitir la información de las neuronas

dopaminérgicas sobre aquellas neuronas blanco de los diferentes sistemas funcionales cerebrales. (44).

Además de los cuerpos neuronales dopaminérgicos localizados en el AVT, también existen otros grupos celulares funcionalmente muy importantes. Tal es el caso de las neuronas GABAérgicas las cuales funcionan como interneuronas locales para controlar la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas (34, 63) Estas neuronas son definidas como secundarias para diferenciarlas de las dopaminérgicas o primarias. Las células primarias comprenden aproximadamente el 60 % del total de neuronas en el AVT, e inmunocitoquímicamente son positivas a la localización de la hidroxilasa de la tirosina. Desde un punto de vista electrofisiológico, estas neuronas siempre responden con una hiperpolarización a la aplicación de dopamina y son inhibidas postsinápticamente por la adición de GABA al baño, inhibición que es mediada tanto por receptores GABA_A como GABA_B (4).

En esta estructura mesencefálica también existen neuronas cuyos neurotransmisores son el neuropéptido FF (7), colecistoquinina (81) y sustancia P (82) entre otras, también neuronas opioérgicas, como las que contienen agonistas tanto μ (mu) como κ (kappa), los cuales inducen una hiperpolarización en las células primarias (45).

También existen neuronas serotoninérgicas, las cuales constituyen neuronas terciarias que inducen potenciales postsinápticos inhibidores (PPSI) mediados a través del receptor a serotonina tipo 5-HT_{1A} (13). Se desconoce en detalle la forma de interacción sináptica entre todos estos componentes neuronales (11).

Por otra parte, además de las eferencias mencionadas, este núcleo recibe importantes contingentes de fibras aferentes, los cuales a través de varios tipos de neurotransmisores modulan en forma muy importante la salida dopaminérgica del mismo. De éstas, las más estudiadas han sido las aferencias

glutamatérgicas provenientes del la corteza prefrontal. Esta aferencias, actuando a través de receptores ionotrópicos y metabotrópicos, modulan la frecuencia de descarga de las células principales (70). Las sinápsis glutamatérgicas sobre las neuronas dopaminérgicas, son objeto de múltiples estudios porque al mostrar un alto grado de plasticidad (18), resultan ser el blanco de los fármacos que causan dependencia física y la porción del circuito que sustenta los mecanismos de potenciación indicativos de una adicción conductual (78).

El análisis de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas dopaminérgicas, se ha realizado tanto en modelos "*in vivo*", como "*in vitro*". En el animal íntegro las neuronas dopaminérgicas registradas con microelectrodos, muestran una resistencia de entrada en un rango de 18 a 45 M Ω ; mientras que, como se esperaría en las neuronas registradas "*in vitro*", i.e., en rebanadas de cerebro y en células cultivadas, se observa una resistencia de entrada mucho mayor, usualmente en el rango de 80-320 M Ω (23, 24). Una de de las neuronas dopaminérgicas del AVT, es la presencia de una rectificación anómala que se presenta cuando la membrana celular se hiperpolariza (26). Esta rectificación es consecuencia de la activación de una conductancia específica, resultado del comportamiento de un canal que se activa con corrientes hiperpolarizantes y que genera una corriente definida como "h" (I_h) (6).

Otra peculiaridad que muestran estas neuronas es su actividad espontánea, la cual se presenta en la gran mayoría de células dopaminérgicas y que es consecuencia de una despolarización dependiente del voltaje, la cual es lenta y sostenida, muy similar a la observada en células que actúan como marcadores del paso. Tal despolarización conduce a la generación espontánea de espigas con una frecuencia en el rango de 2-9 impulsos/seg, y en ocasiones, con la presencia de episodios en ráfagas que muestran decrementos secuenciales en la amplitud de las espigas. Existe una alternancia entre las

espigas con una actividad de marcador del paso con una post-hiperpolarización observable sobre todo en el disparo altamente regular de las neuronas dopaminérgicas en preparaciones de rebanadas de cerebro (26) y en células dopaminérgicas disociadas (29). En ocasiones las neuronas dopaminérgicas registradas "*in vivo*" disparan de una forma sumamente irregular; sin embargo, las aplicaciones intracelulares de EGTA (etilenglicol-bis-aminoetiletetraacetato), un quelante de iones calcio, transforman el disparo irregular a uno altamente regular, lo que sugiere que la respuesta tipo marcador del paso depende de conductancias de calcio (Ca^{2+}) y de sodio (Na^{+}), ya que la administración de bloqueadores respectivos, cobalto (Co^{2+}) y tetrodotoxina (TTX), inhiben la generación espontánea de espigas en estas células.

Las células dopaminérgicas registradas "*in vitro*" muestran espigas bifásicas o trifásicas de larga duración (2-5 msec) con una prominente fase negativa. Sus potenciales de acción, se generan a partir de un potencial de membrana de aproximadamente -51 mV "*in vivo*" y -46 mV "*in vitro*". Por lo tanto, la membrana de neuronas dopaminérgicas debe despolarizarse aproximadamente de 15 a 25 mV (de su nivel de potencial de membrana en reposo de -51 mV) para alcanzar al nivel umbral de descarga de potenciales de acción (22, 24).

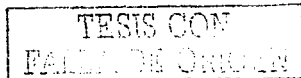
Las células dopaminérgicas muestran un rango limitado de actividad, con frecuencia de disparo promedio de 4.5 Hz en la rata anestesiada, aunque son capaces de disparar a un máximo de 10 Hz. Estas neuronas, después de mostrar un patrón de descargas simples durante cierto tiempo, inicia un patrón de descargas en ráfagas, con un intervalo inter-espigas muy largo. Éstas, pueden consistir de hasta 15 espigas o más y generalmente se asocian con despolarizaciones de gran amplitud y duración en las membranas de estas células dopaminérgicas (25)

Los registros en rebanadas muestran también neuronas que disparan de una forma similar a un marcador del paso, y prácticamente no se observan

descargas en ráfagas de forma espontánea, lo que sugiere que esta actividad depende de la presencia de las aferentes correspondientes, probablemente de aquellas glutamatérgicas que provienen de la corteza prefrontal (59). Finalmente, la tercera característica electrofisiológica de las neuronas dopaminérgicas, es su sensibilidad a la misma dopamina. Debido a que estas células poseen receptores a la dopamina de la clase D_2 , entonces la aplicación de dopamina o sus agonistas hiperpolariza a estas neuronas y como consecuencia inhibe la descarga espontánea que éstas presentan (56).

Las propiedades electrofisiológicas de las neuronas dopaminérgicas son moduladas por el resto de células existentes en el AVT, particularmente los sistemas de interneuronas liberadoras de GABA y las aferencias provenientes de la corteza prefrontal, emplean al glutamato como neurotransmisor (35, 49).

También en el AVT existen neuronas GABAérgicas de salida que proporcionan una aferencia inhibitora sobre las neuronas de la corteza prefrontal. Estas neuronas GABAérgicas a su vez, son controladas por una entrada glutamatérgica a través de receptores tipo NMDA desde las mismas estructuras corticales (66). En condiciones "*in vivo*", estas neuronas GABAérgicas muestran una actividad espontánea relativamente rápida de aproximadamente 19Hz, con una actividad fásica ininterumpida caracterizada por periodos alternantes de actividad (ON) (0.5-2 seg) y periodos de inactividad (OFF) en el mismo intervalo de tiempo; registros sin filtrar muestran potenciales de acción bifásicos caracterizados por un gran componente inicial negativo al cual le sigue un componente pequeño positivo. A diferencia de las neuronas primarias o dopaminérgicas, las neuronas secundarias o GABAérgicas carecen de una corriente post-hiperpolarizante de rectificación entrante. Su potencial de membrana es cercano a los -60 mV y generan espigas grandes de aproximadamente 70 mV, estas neuronas no muestran actividad en ráfagas como las dopaminérgicas corticales (66).



Las neuronas dopaminérgicas del AVT poseen receptores GABAérgicos postsinápticos tanto de tipo GABA_A como GABA_B, ambos receptores median una acción hiperpolarizante, siendo la mediada por GABA_A de tipo fásica (de aparición rápida y de corta duración), mientras que la mediada por los receptores GABA_B es una inhibición tónica de lento inicio, de menor intensidad pero de mayor duración; los receptores GABA_A se en otras células del AVT, ya que hay estudios que indican la presencia de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) para las subunidades de este receptor (2). Este neurotransmisor ejerce un efecto depresor de la excitabilidad no sólo en las neuronas dopaminérgicas del AVT, sino también en células no-dopamérgicas de la misma región (79).

Mientras los sistemas GABAérgicos reducen la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas del AVT, los sistemas glutamatérgicos de la corteza prefrontal ejercen un efecto excitador potente sobre estas mismas células. Así las descargas en ráfagas son inducidas por la aplicación de glutamato o de N-metil-D-aspartato (NMDA) agonista de este neurotransmisor (25). Las sinápsis glutamatérgicas del AVT se caracterizan por manifestar diversos fenómenos asociados a la plasticidad neuronal como es el caso de la potenciación de largo plazo y la depresión también de largo plazo (4).

Los mecanismos de señalización provenientes de la corteza prefrontal que emplean glutamato como neurotransmisor, actúan sobre receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA/Kainato) para inducir principalmente potenciales postsinápticos excitadores (PPSE) (55); aunque también emplea receptores metabotrópicos (mGluR) para modular neuronas en una escala de tiempo más lenta a través de cascadas de segundos mensajeros, que incluyen hidrólisis de fosfoinosítoles (57).

Electrofisiológicamente, la estimulación de los receptores NMDA y los no-NMDA (AMPA/Kainato) induce una depolarización de las células

TESIS CON
PALLA DE OROSEL

dopaminérgicas, a través de generar una corriente post-sináptica entrante, con un componente lento mediado por receptores NMDA, mientras que el componente rápido deriva de la estimulación de los receptores no-NMDA (43). Estas sinapsis glutamatérgicas provenientes de la corteza prefrontal hacia el AVT, son vías importantes de modulación en los procesos de reforzamiento natural, así como de sensibilización conductual a fármacos psicoestimulantes (37). No obstante, el carácter excitador de GLU, se describió un potencial postsináptico inhibitorio (PPSI) en neuronas dopaminérgicas del AVT, el cual está mediado por la activación de receptores metabotrópicos principalmente el mGluR1, observándose una movilización de calcio de almacenes intracelulares sensibles a cafeína/riánodina y un incremento en la conductancia de K^+ sensible a Ca^{2+} (rSK3) la cual es eliminada por el bloqueador apamina (17).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Planteamiento del Problema:

La administración sistémica de galfimina-B muestra efectos importantes sobre algunas estructuras del tallo cerebral, principalmente en las neuronas del mesencéfalo, particularmente en aquellas localizadas en el área ventral tegmental de Tsien (73). En registros unitarios extracelulares, los efectos observados después de la administración sistémica de este compuesto fueron dependientes de la dosis y se observaron tanto incrementos como decrementos en la frecuencia de disparo de las neuronas de esta estructura. Cuando la aplicación del fármaco se realizó mediante la técnica de microiontoforesis, es decir, el fármaco se aplicó en la inmediata vecindad de la neurona registrada, únicamente se observaron reducciones de la frecuencia de disparo, lo que sugiere que los incrementos observados durante la aplicación sistémica son inducidos de manera indirecta.

De acuerdo al perfil farmacológico encontrado en los modelos experimentales durante el cernimiento del fármaco (72) y a las descripciones sobre su uso empírico en el tratamiento como tranquilizante (16); es posible proponer que los efectos farmacológicos de este compuesto son muy similares a los provocados por el GABA o por la presencia de agonistas a sus receptores. Los textos clásicos de la farmacología muestran que, dependiendo de las dosis de GABA o de sus agonistas empleados, es posible desencadenar ansiolisis, sedación, hipnosis, efectos anticonvulsivos y en general una depresión importante del sistema nervioso central (31). Por lo tanto, un posible mecanismo de acción de la galfimina-B podría ser resultado de una acción agonista GABAérgica, ya sea por una interacción directa con el receptor o actuando de una forma similar a como lo hacen otra serie de agonistas GABAérgicos, los cuales modifican en forma alostérica el sitio de unión a GABA incrementando la eficacia de tal unión, como es el caso de las benzodiazepinas (64), los barbituratos (75) y el alcohol (21). Aunque este tipo

de efectos también puede resultar de otros mecanismos independientes al GABAérgico. Por ejemplo, una acción depresora de la transmisión glutamatérgica, o la activación de mecanismos depresores de estas neuronas dopaminérgicas, de forma similar a como lo hacen los opioides y la serotonina. El análisis electrofisiológico de tal suposición implicaría determinar a nivel celular los efectos ejercidos por el GABA sobre las neuronas dopaminérgicas del AVT, para posteriormente, y en forma comparativa, determinar los efectos de la galfimina-B sobre estas mismas neuronas. Además si ambos efectos son similares, el empleo de fármacos agonistas o antagonistas del GABA podrían darnos una idea del tipo de interacción agonista que existe entre este neurotransmisor y la galfimina-B.

Tal análisis implicaría además el disociar las diferentes respuestas inducidas por los varios de los neurotransmisores localizados en esta zona. Inicialmente, será necesario el identificar de la forma más exacta a las células dopaminérgicas (en las cuales se realizará el registro), ello puede llevarse a cabo desde un punto de vista electrofisiológico, a través de observar su frecuencia de descarga espontánea, determinar el efecto depresor que la dopamina ejerce sobre ella y finalmente, determinar la presencia de una corriente de tipo I_h (66). Posteriormente, registrar las corrientes sinápticas inducidas por la estimulación eléctrica de campo en las inmediaciones de la célula que se registra. Estas corrientes sinápticas, las cuales resultan de la activación de canales iónicos inducidas por los diferentes neurotransmisores, serán disociadas, empleando diferentes fármacos, para registrar únicamente las corrientes que son consecuencia de un solo tipo de neurotransmisión. Debido a que el GABA y el glutamato son los principales moduladores de la excitabilidad de estas neuronas (76), los estudios de este compuesto deben de ser encaminados a analizar la interacción de la galfimina-B con estos sistemas.

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

Hipótesis:

Si los efectos depresores provocados por la galfimina-B son consecuencia de su interacción con los sistemas GABAérgicos del AVT, entonces estas acciones serán similares a las de GABA, cuando se administren agonistas y antagonistas GABAérgicos o de ambos.

Objetivos:

- 1) Registrar las corrientes sinápticas miniatura espontáneas (mEPSCs) en las neuronas dopaminérgicas del AVT, como un dato indicativo de la actividad sináptica basal de estas neuronas, determinando el efecto que el GABA y la galfimina-B ejercen sobre estos mEPSCs.
- 2) Describir las corrientes excitadoras glutamatérgicas inducidas por estimulación eléctrica y su comportamiento por la adición de GABA y galfimina-B.
- 3) Determinar los potenciales postsinápticos inhibidores (IPSPs) mediados a través del GABA y determinar su modificación por antagonistas GABAérgicos y por galfimina-B.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Metodología.

Obtención del material vegetal.

La planta *Galphimia glauca* Cav., se colectó en el estado de Guanajuato, México, se conservó un espécimen como muestra, cuyo Voucher se encuentra bajo resguardo en herbario IMSSM con el número de registro 8645 y 8646. El material colectado fue secado y molido, las partes aéreas de esta especie fueron tomadas para llevar a cabo el procedimiento químico de separación descrito anteriormente (74), y obtener el producto 13-carbometoxi-4R-7, 18-tri-hidroxi-30-nor-3,4 seco-fridela-1,20-dien3,24-olide, cuyo nombre trivial es galfimina-B (fig. 2)

Rebanadas de AVT en rata.

Todos los experimentos fueron llevado a cabo siguiendo las guías internacionales y nacionales sobre el cuidado y uso ético de animales de investigación.

Los animales empleados fueron ratas de la cepa Wistar con un peso aproximado de 200 a 250g. Estos animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio al menos una semana para su adaptación. Durante ese tiempo tuvieron acceso al agua y alimento a libre demanda. El día de registro el animal se anestesió con isofluorano al 3%, para inmediatamente ser decapitado con una guillotina (Stoelting). Rápidamente, el cráneo se separaba con unas pinzas y el cerebro era disecado después de cortar los nervios ópticos, esta maniobra tomaba aproximadamente 50-60 segundos. Una vez extraído el cerebro se colocó en un recipiente con una solución semejante al líquido cefalorraquídeo a 4°C. La composición de esta solución en mM fue: NaCl 126, KCl 1.6, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 18 y glucosa 11, pH= 7.35 y osmolaridad de 290 mOsm, además de mantener un burbujeo constante de una mezcla de O₂ al 95% y de CO₂ al 5%.

TESIS CON
FALLA DE CALIDAD

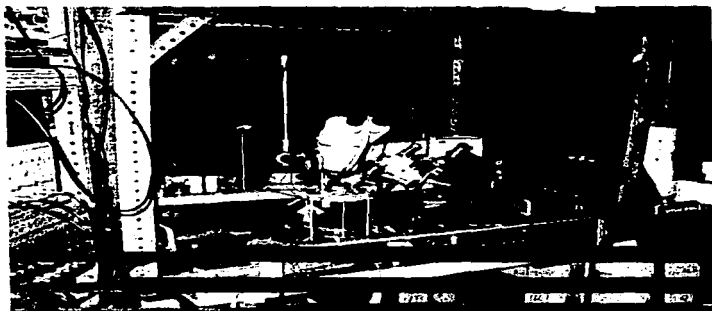


Fig. 4. Sistema de registro con los implementos necesarios para llevar a cabo la técnica de *patch-clamp* modalidad célula íntegra.

Después de 40 segundos se colocó el cerebro en un papel filtro húmedo con la solución y se realizaron los cortes correspondientes para obtener un bloque de tejido que contenía al mesencéfalo. Finalmente se realizó un corte horizontal del tejido a la altura del cuarto ventrículo, para obtener la región anterior al AVT, por donde provienen las fibras procedentes de la corteza prefrontal.

El tejido fue entonces colocado en la platina del vibrotomo, inmediatamente después de un bloque de agar sólido para protegerlo. Éste, se fijaba por medio un pegamento instantáneo (cianoacrilato) por la parte inferior del bloque de tejido. La platina se colocó dentro del pozo del vibrotomo (Pelco 101, series 1000), el cual tiene una capacidad de 450 ml y se encontraba lleno con la misma solución a 4 °C, de tal manera que el bloque se sumergía al menos 0.5 cm por debajo del nivel de la solución. Empleando un vibrotomo, y a una velocidad de corte de 2.5 mm/seg y una amplitud de vibración de 10 mm, se obtuvieron rebanadas horizontales en el sentido anterior-posterior de

aproximadamente 400-450 μm . Por este procedimiento es posible obtener 3 rebanadas de cada hemisferio que contengan al AVT.

Posteriormente las rebanadas se transportaron a una pequeña cámara llena con la misma solución a temperatura ambiente y burbujeadada en forma constante con la misma mezcla de gases. Esta cámara posee pozas de aproximadamente 1cm de diámetro, con un fondo en forma de red para sostener el tejido y al mismo tiempo cubrirlo completamente con la solución. Las rebanadas permanecían en esta solución durante al menos 60 minutos antes de iniciar el registro. El objetivo de ello es permitir un equilibrio con la solución y tratar de restablecer las condiciones sinápticas en las células vivas que fueron perturbadas por el traumatismo del procedimiento.

Para su registro las rebanadas fueron transferidas a una cámara de registro fabricada en el laboratorio (Fig. 4). Se trata de una poza de 3 ml con una entrada inferior y una salida en la parte más alta de la misma, la velocidad del flujo se ajustó a 1.5- 2.0 ml/min a través de una presión hidrostática generada gravedad. Este frasco contiene el mismo tipo de solución a una temperatura de 35 °C, mantenida por una manguera de tygon enrollada al frasco y conectada a un recirculador (HAAKE B3), el cual mantenía un flujo constante de agua destilada a 40 °C. El Frasco contenía un disipador de aire conectado a un tanque con carbógeno (95 % O_2 y 5% CO_2), que mantenía una presión parcial de O_2 y CO_2 adecuadas en la solución.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

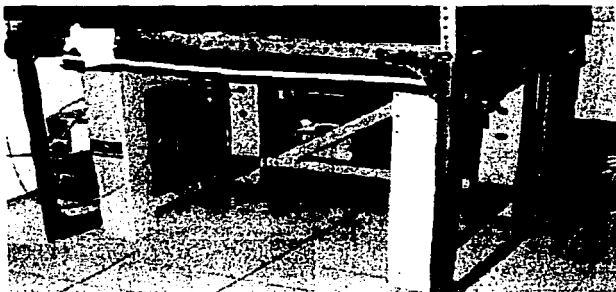


Fig. 5. Mesa vibro-aislante neumática empleada para reducir tanto las oscilaciones horizontales como verticales indispensables para llevar a cabo el registro.

Una bomba peristáltica (Watson-Marlow) mantenía el flujo de salida constante, enviándolo a un depósito para su desecho. La manguera del flujo de entrada estaba localizada dentro de un tubo de "tygon" donde circulaba agua destilada a una temperatura de 40 °C en sentido opuesto al flujo de la solución, con lo cual la solución de entrada se calentaba por un mecanismo de contracorriente. La vía de entrada se conectaba a través de llaves de tres vías con jeringas de 20 ml donde se colocaba la misma solución pero ahora con un fármaco añadido. Entonces la administración simplemente consistía en interrumpir el flujo proveniente del frasco para conectar el flujo a través de la jeringa que contenía el fármaco o la combinación de fármacos cuando se realizaban aplicaciones conjuntas.

Mediante este tipo de aplicación de fármacos se alcanza una concentración constante del mismo en un tiempo de aproximadamente 4 a 6 minutos y de acuerdo a la tasa del flujo utilizado, esta administración tenía una duración de aproximadamente 15 minutos. Siempre que una jeringa se cambiaba o conectaba, se extraían todas las burbujas de aire para evitar alteraciones en el registro por el movimiento provocado por las mismas al

alcanzar la poza de registro. En ocasiones y para evitar el fenómeno de desensibilización algunos fármacos fueron aplicados empleando una picobomba (WPI 230 PB) y una micropipeta colocada en la inmediata vecindad de la célula en registro.

La cámara de registro se encontraba dentro de una cámara de Faraday de 1.2 m de ancho 1.8 m de largo y 1.4 m de altura, empleada para reducir al máximo la interferencia eléctrica proveniente del medio ambiente. Esta cámara de registro se encontraba sobre una mesa vibro-aislante neumática, (TIMCO 1200) que utiliza nitrógeno para levantar 4 pistones, fijada a la superficie de la mesa con tornillos especiales.

Las rebanadas se colocaron sobre una malla de "nylon" fijada en la parte superior de la poza de registro y sobre un trozo de papel filtro que permite el flujo ascendente de la solución. La rebanada se mantenía fija utilizando unos pequeños trozos de alambre de plata No. 18 de aproximadamente 1 cm colocados en los bordes de la misma. Mientras que la zona de registro, el AVT, se circunscribía con rejillas para microscopía electrónica de platino. La visualización de la estructura a registrar y de la colocación del electrodo se realizó empleando un estereoscopio (Carl Zeiss) con zoom de 3 a 20 veces de amplificación colocada en la superficie de la rebanadas. Dentro de la cámara de Faraday también se encuentra un micromanipulador (Newport 350 AR) con movimiento en las tres dimensiones en escalas de una micra Fig. 4. Este micromanipulador fue empleado para desplazar el electrodo de registro a través de la región elegida.

Registros electrofisiológicos.

Los registros intracelulares fueron realizados con micropipetas de vidrio de borosilicato con filamento interno (diámetro externo 1.3 mm, diámetro interno 1.1 mm, WPI 130 IF) estirados en un flamómetro (Sutter 87P) calibrado de tal manera que la punta del microelectrodo estuviera entre 0.2 y 0.8 μm y

mostraban una impedancia *in situ* de entre 80 y 110 M Ω . Los electrodos se llenaron con acetato de potasio 2M y se preparaban inmediatamente antes de su empleo. Estos electrodos se colocaron en un micromanipulador mecánico el cual descendía sobre la rebanada formando un ángulo de entre 45 y 60 grados sobre la superficie de la rebanada. Una media célula eléctrica (WPI HC350) sumergida en el baño hacía la veces de electrodo de referencia.

El registro se iniciaba con la colocación del electrodo en la superficie de la rebanada, el cambio en el ruido circundante nos indicaba cuando la punta del electrodo tocaba la superficie acuosa de la rebanada. Posteriormente el continuo descenso del microelectrodo en etapas de 1 μm , fue suficiente para penetrar las células, lo cual fue monitorizado por el brusco cambio en el nivel del potencial registrado entre el microelectrodo y el electrodo de referencia. A partir de ese momento se registró en forma continua el potencial de membrana, empleando un amplificador Axoclamp 2A (Axon Instruments) en modo puente, aplicando un pulso hiperpolarizante de 5 mV y 0.4 mseg de duración a 0.1 Hz, para monitorizar en forma continua la resistencia de entrada de la célula.

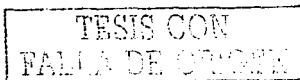
Las señales eléctricas registradas fueron digitalizadas por un convertidor analógico digital Digidata 1200 (Axon Instruments) conectado a una microcomputadora PC (Digital Venturis 466). Tanto la captura como el análisis de las señales eléctricas registradas, así como el protocolo de estimulación que enviaba el pulso de prueba, fueron realizadas con el software de pClamp 6.0 (Axon Instruments). Estas señales fueron filtradas a una velocidad de 5 kHz y capturadas a 20 kHz. Los potenciales post sinápticos inhibidores (PPSIs) fueron inducidos por estimulación eléctrica en la inmediata vecindad de la célula de registro. Para ello se colocó un electrodo bipolar de tungsteno alrededor de 400 a 600 μm rostrales al sitio de registro, para provocar la transmisión sináptica. Este electrodo fue fabricado con dos alambres trenzados de tungsteno de 60 μm de diámetro aislados con teflón a excepción de las puntas, las cuales estaban

separadas aproximadamente 300 μm , y se conectaban a través de una unidad de aislamiento fotoeléctrica (AMPI IU400) a un generador de pulsos (AMPI Master 8). El estímulo eléctrico consistía de pulsos con una duración de 0.03 mseg, y con una intensidad de 10-25 mV, aplicados a una frecuencia de 0.1, 1 y 0.3 Hz.

El procedimiento de registro consistió en que una vez que se penetraba una célula, se observaba su potencial de membrana durante 10 a 15 minutos sin realizar algún tipo de maniobra experimental, si el potencial tendía a modificarse significativamente o se mostraba un decremento de la resistencia de entrada celular, entonces se desechaba la célula y se procedía a buscar otro ejemplar. Si después de 15 minutos la célula mantenía su potencial de membrana con muy pocas oscilaciones y no se mostraban cambios significativos en la resistencia de la membrana entonces se procedía a registrar la actividad espontánea de la célula y determinar el efecto que la dopamina (30 μM) ejerce sobre esa actividad espontánea. Posteriormente en modo de fijación de corriente se aplicaba un conjunto de pulsos de corriente hiperpolarizantes tendientes a determinar la presencia de una rectificación anómala característica de estas neuronas. Finalmente se procedía a estimular la rebanada. Para ello se suspendía el pulso de prueba de la resistencia y se iniciaba el pulso de inducción de los IPSPs, usualmente primero con valores de intensidad mínimos y posteriormente incrementando la intensidad hasta lograr respuestas reproducibles y constantes.

La línea basal de los registros de las respuestas inducidas eléctricamente fue considerada el potencial de membrana encontrado durante los 100 mseg que precedían al artefacto del estímulo, mientras que la amplitud pico fue definida como la máxima diferencia en amplitud, desde la línea basal, encontrada en los 100 mseg después del artefacto del estímulo.

Debido a que la estimulación de campo provoca respuestas tanto excitadoras como inhibitorias, fue necesario bloquear las respuestas excitadoras



para registrar únicamente las inhibitorias. Para ello se empleo tetrodotoxina, con la finalidad de bloquear las corrientes de sodio y con ello la generación de potenciales de acción. Además se añadió al baño un bloqueador de receptores glutamatérgicos de tipo AMPA/Kainato (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona, CNQX) a una concentración de 10 μM y un bloqueador también glutamatérgico pero ahora de tipo selectivo para receptores del tipo NMDA como lo es el AP-5 (ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico) a una concentración de 100 μM . Con el empleo de ambos fármacos es posible bloquear todas las respuestas excitadoras sinápticas. Una vez que los IPSPs estuvieron disociados se procedió a realizar las maniobras experimentales necesarias para determinar el efecto de la galfimina-B sobre esta transmisión.

Para analizar el efecto de este compuesto sobre la transmisión excitadora en las neuronas dopaminérgicas del AVT, realizamos estudios por medio de la técnica de *patch-clamp*, modalidad célula integra. Para ello empleamos electrodos fabricados con pipetas de borosilicato de sodio de 1.5 mm de diámetro externo y 1.2 mm de diámetro interno que contenían un filamento en su parte interior (WPI 150IF). Estas pipetas fueron hechas en un estirador vertical de dos pasos (Narishige pp83) hasta obtener puntas de 1 a 1.6 μm y con resistencias que oscilaron entre 1 a 3 $\text{M}\Omega$. Estos electrodos se llenaron empleando una jeringa con una aguja larga del número 31 con una solución que contenía en mM: Gluconato de Potasio 120, MgCl_2 2; CaCl_2 1; EGTA 11; HEPES 10, glucosa 10 y MgATP 2.5 MgGTP 0.25. La solución fue rigurosamente titulada para obtener un pH de 7.25 a 7.35, empleando KOH y su osmolaridad fue de 300 mOsm.

Los electrodos se preparaban inmediatamente antes de su empleo para evitar la presencia de partículas de polvo en la punta que pudiesen impedir la formación de buenos sellos. Estos electrodos se montaron en el cabezal del amplificador (Axopatch 1D, Axon Instruments) el cual se encontraba sobre un

micromanipulador mecánico (Newport 350 MR). Este dispositivo produce desplazamientos en los tres ejes en distancias de 1 μm . La salida del amplificador alimentaba un osciloscopio, el cual monitorizaba los registros continuamente. Esta misma señal fue digitalizada empleando una tarjeta convertidora analógico-digital (Digidata 1200, Axon Instruments), cuya salida fue almacenada y analizada con el programa de pClamp 6.0 (Axon Instruments) en una computadora PC (Digital Venturis 466). La sesión se iniciaba con la aplicación de un pulso comando (aproximadamente 5 mV) proporcionado por el amplificador, el cual era visualizado en el osciloscopio; entonces se procedía a aplicar una presión positiva al electrodo (30 mm de H_2O) colocándose en la superficie inmediata de la región del AVT, para iniciar su descenso sobre la misma. Cuando el electrodo tocaba la superficie líquida de la rebanada se observaba un cambio en el ruido de fondo del registro y una reducción del pulso comando. Lentamente el electrodo se descendía sobre la región a estudiar y cuando se detectaba una reducción importante del pulso comando, indicación de un incremento en la resistencia, entonces se acercaba más lentamente, buscando la posición en la que el pulso prácticamente desapareciera y únicamente se observarían las transientes capacitivas del mismo.

En este momento se aplicó una presión negativa (aproximadamente de -40 a -60 mm de H_2O) estableciéndose la formación de un sello de alta resistencia (4 a 30 $\text{G}\Omega$). Finalmente se procedía a obtener el acceso al interior de la célula por lo que era necesario el romper la membrana celular localizada en la luz del electrodo. Esto se conseguía usualmente con una mayor presión negativa o empleando el botón Zap del amplificador, el cual genera una vibración eléctrica de alta frecuencia. El acceso al interior de la célula se manifestaba por el cambio en las transientes capacitivas del pulso comando las cuales se incrementaban considerablemente en duración.

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

La resistencia en serie osciló entre 10 a 20 M Ω y no se compensó para mantener la proporción señal-ruido lo más alta posible. Sin embargo todas las células que mostraron un cambio en la resistencia en serie mayor al 10% durante el registro o durante la aplicación de fármacos se descartaron del conjunto de células reportadas en este experimento. Las señales inducidas por la estimulación eléctrica fueron filtradas a una velocidad de 5 kHz y capturadas a 20 kHz, mientras que las señales espontáneas se filtraron a 1 kHz y se capturaron a 5 kHz.

Cuando la célula mostraba corrientes de sodio correspondientes a potenciales de acción, se aplicó una concentración de dopamina (30 μ M) para determinar el efecto de la misma. Posteriormente el potencial de membrana se fijó inicialmente en -30 mV, en presencia de tetrodotoxina (2 μ M), para analizar la presencia de corrientes inducidas por la hiperpolarización (I_h). Para esto se aplicó un protocolo de pulsos que llevaban el potencial de membrana desde -30 hasta -125 mV en etapas de 10 mV durante 600 msec, con un intervalo de 5 segundos entre cada pulso. Una vez analizada la presencia de tales corrientes se fijó el potencial de membrana en -70 mV por todo el resto del experimento.

Para registrar las corrientes excitadoras se aplicó una concentración de tetrodotoxina (TTX 2 μ M) necesaria para bloquear la presencia de potenciales de acción espontáneos, además de que fue necesario minimizar al máximo las respuestas inhibitoras tanto espontáneas como inducidas por la estimulación de campo. Por lo tanto, para bloquear las respuestas inhibidores rápidas y lentas mediadas por la activación de receptores GABA_A y GABA_B, respectivamente, se añadió al baño de la rebanada una concentración de picrotoxina (100 μ M) y saclofén (200 μ M).

Las primeras señales a registrar fueron las corrientes postsinápticas excitadoras espontáneas en miniatura. Con el voltaje fijo en -70 mV se

monitorizaron y capturaron estas señales empleando el programa de Clampex 6.0 (Axon Instruments), mientras que el análisis de estas señales se realizó con el programa de MiniAnalysis (Synaptosoft). Los criterios de detección de estas corrientes fueron establecidos de tal manera que la amplitud tenía que ser mayor a 10 pA, la tasa de incremento inicial debía ser menor a 1 mseg y la tasa de decaimiento menor a 3 mseg. Estas señales se registraron en condiciones basales y durante la administración de GABA (10 μ M) y de galfimina-B (100 μ M).

Las corrientes excitadoras postsinápticas (EPSCs) fueron inducidas por la estimulación de campo empleando el mismo tipo de electrodos, equipo y parámetros que los utilizados para inducir los potenciales inhibidores postsinápticos.

La amplitud de las corrientes excitadoras postsinápticas fue determinada en tiempo real empleando el programa de Clampfit 6.0 (Axon Instruments). Además estas mismas señales fueron también analizadas y seleccionadas posteriormente, con base en su amplitud, su tasa de incremento, criterio de área superficial, así como su latencia y duración. Todos los datos numéricos son expresados como media \pm error standard. Además de que las diferencias en los datos en situaciones control y después de añadir los fármacos, los datos fueron analizados empleando la prueba de *t* pareada; mientras que las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba *t* de Student. Todas las maniobras experimentales fueron repetidas en al menos 12 diferentes células. Una rebanada nueva fue usada para cada experimento, de tal manera que las células fueron expuestas sólo una vez a cualquier fármaco. Con excepción de la galfimina-B, todos los fármacos fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St Louis, Mo) y preparados inmediatamente antes de su administración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados.

De un total de 956 rebanadas utilizadas, provenientes de 32 ratas, sólo en 68 se observaron células en la región del AVT que reunían las características de estabilidad y señales eléctricas requeridas. Estas neuronas fueron registradas ya sea con microelectrodo en experimentos de fijación de corriente ($I=0$) o de fijación de voltaje con la técnica de *patch-clamp*, en la modalidad célula-integra. Todas las neuronas registradas fueron identificadas como primarias (dopaminérgicas) o secundarias (GABAérgicas) empleando al menos tres de los criterios bien establecidos en la literatura científica (66). Inicialmente, se determinó el tipo de descarga espontánea que presentaron estas neuronas. La figura 5 muestra un ejemplo representativo de éstas.

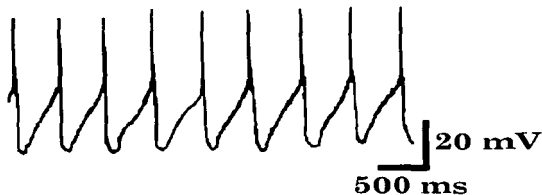


Fig. 5. Las neuronas dopaminérgicas del AVT fueron identificadas empleando tres criterios electrofisiológicos establecidos, el primero, como se observa en esta figura es la presencia de una descarga espontánea regular con un potencial de membrana en reposo inestable, similar a la descarga de las células que son marcadoras del paso. Además sus espigas son de larga duración, aunque en este ejemplo debido a una frecuencia de descarga alta (2.3 Hz), las espigas muestran una duración entre 435-500ms.

Se trata de espigas únicas, con descargas muy regulares, las cuales mostraron una frecuencia que osciló entre 0.7 y 4.2 Hz con un promedio de 1.87 ± 0.85 Hz, la amplitud de las espigas osciló entre 58.4 y 73.1 mV con un promedio de 63.7 ± 7.8 mV, mientras que la duración de los potenciales mostró

un rango de 645 a 2.36 msec con un promedio de 1.96 ± 0.87 msec, es decir fueron espigas de gran amplitud. Una de las características importantes de la misma fue la inestabilidad de su potencial de membrana en el periodo inter-espiga, como se muestra en la figura, estas células mostraron una lenta despolarización durante el reposo, que finalmente alcanza el nivel umbral y provoca la descarga de un potencial de acción. En estas circunstancias se procedió a la aplicación de $30 \mu\text{M}$ de dopamina al baño de tejidos. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la figura 6.

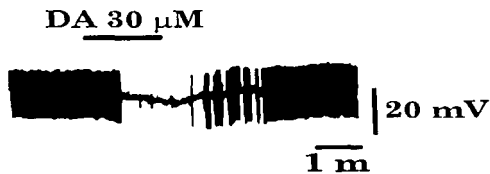


Fig. 6. La adición al baño de una concentración de $30 \mu\text{M}$ de dopamina indujo un efecto depresor importante sobre la frecuencia de descarga de estas neuronas. En el 62.9% de las células registradas esta disminución fue total, mientras que en las restantes fue menos importante. Como se observa en la figura, esta disminución se asoció a una hiperpolarización del potencial de membrana.

La dopamina indujo un estado de hiperpolarización en las células primarias registradas, mientras que no tuvo efecto alguno en las secundarias. Esta hiperpolarización en promedio fue de -8.2 ± 0.8 mV y provocó una reducción muy importante de la descarga espontánea que estas neuronas poseían. En el 69% de las neuronas primarias registradas ($n=43$) la inhibición de la descarga espontánea fue total, mientras que en el porcentaje restante el decremento fue parcial aunque importante.

En experimentos realizados con fijación de voltaje en *patch-clamp*, se registró la presencia de una corriente que se activa con la hiperpolarización y que es característica de las neuronas dopaminérgicas

del AVT. Esta corriente ha sido descrita como I_h y se muestra en la figura 7.

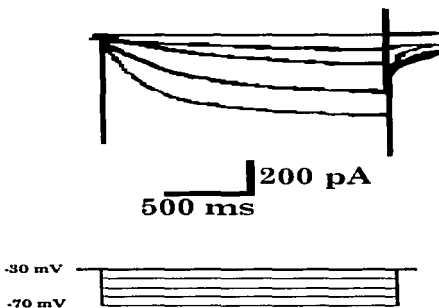


Fig. 7. La aplicación de un protocolo de pulsos mostrado en la parte inferior de la figura, induce la aparición de una corriente entrante que muestra una cinética ejemplificada en la parte superior de la figura. En este caso el potencial de membrana se fija en -30 mV y se aplicaron pulsos hiperpolarizantes en etapas de 10 mV hasta llegar a -70 mV.

Del total de neuronas registradas ($n=68$) sólo 43 células cumplieron con las tres características por lo que fueron consideradas como primarias, mientras que las restantes 25 se caracterizaron como secundarias, éstas no mostraron ninguna modificación en sus parámetros electrofisiológicos por la adición de la galfimina-B; los resultados reportados en este trabajo sólo comprometen los hallazgos de las 43 neuronas primarias.

En el total de neuronas dopaminérgicas del AVT el potencial de membrana en reposo cuantificado inmediatamente al final de la espiga fue en promedio de -62.3 ± 5.6 mV con un umbral para la espiga, también en promedio de -49.6 ± 0.9 mV. Mientras que las células secundarias que no mostraban espigas en forma espontánea registraban un potencial de membrana promedio de -54.9 ± 2.3 mV ($n=25$). En registros de fijación de corriente con

microelectrodo, las células dopaminérgicas mostraron una resistencia de entrada de $183.8 \pm 6.7 \text{ M}\Omega$ medida a -60 mV . La cual no se modificó a lo largo del experimento, ni por acción de alguno de los fármacos aplicados, más allá del 8% de su valor inicial.

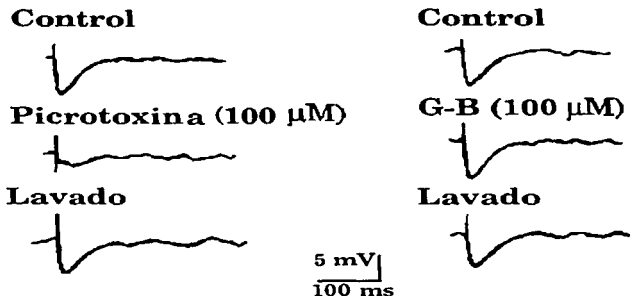


Fig. 8. Después de bloquear las respuestas excitadoras, la estimulación de campo en los registros de fijación de corriente con microelectrodo provocó potenciales inhibidores postsinápticos (PPSIs), los cuales fueron bloqueados casi en su totalidad (87%) por la adición de picrotoxina ($100 \mu\text{M}$) pero no fueron modificados en forma significativa por la adición de galsimina-B en concentraciones de $1\mu\text{M}$ - 5mM . En este registro se ejemplifica el efecto obtenido con $100 \mu\text{M}$.

La estimulación de campo en estas neuronas en presencia de AP-5 ($100 \mu\text{M}$) y CNQX ($10 \mu\text{M}$), los cuales bloquean las respuestas excitadoras glutamatérgicas además de TTX ($2 \mu\text{M}$), indujo la aparición de potenciales postsinápticos inhibidores inducidos por GABA como los que se muestran en la figura 8. Estos potenciales mostraron una latencia cuyo promedio fue $1.4 \pm 0.08 \text{ mseg}$ ($n=24$) y una amplitud pico promedio de $-7.34 \pm 1.15 \text{ mV}$, la cual fue alcanzada después de $13.7 \pm 2.7 \text{ mseg}$ de aplicación del estímulo. La duración total del evento, es decir el retorno a la línea basal ocurrió en promedio hasta los

104.6 \pm 9.3 mseg. Cuando en esta situación se añadió al baño de la rebanada picrotoxina (bloqueador del receptor GABA_A ionóforo de Cl⁻) en concentraciones de 10 hasta 1000 μ M, se observó un bloqueo de estas señales electrofisiológicas. Con la dosis de picrotoxina de 100 μ M se redujo significativamente la respuesta hasta -2.4 \pm 0.6 mV ($p < 0.01$), efecto que es mostrado en la Fig. 8. El efecto supresor de la picrotoxina fue observado principalmente en los primeros 45 mseg del registro, con un efecto menor en el componente más tardío. Bajo las mismas condiciones experimentales la adición de galfimina-B en concentraciones que oscilaron entre 5 μ M y 1mM no mostraron efecto alguno, ya sea agonista o antagonista, ni sobre la resistencia de entrada ni sobre la amplitud, latencia, duración, de estos potenciales; en presencia de galfimina-B la amplitud de estos potenciales en promedio fue de -7.54 \pm 1.32 mV y su duración promedio fue de 106.7 \pm 9.4 mseg. ($p < 0.89$). Tampoco fue observable algún cambio en el patrón de respuesta registrada como se observa en la figura 8.

Los efectos de galfimina-B también se evaluaron sobre la amplitud de los potenciales postsinápticos inhibidores y como se modificaron éstos con respecto al tiempo. Durante el registro, entre el minuto 5 y 15 se añadió al baño una concentración de 100 μ M de galfimina-B y se observó su efecto sobre la amplitud de la señal. Posteriormente entre el minuto 25 y 35 se añadió una concentración de 100 μ M de picrotoxina, y se determinó su efecto sobre la amplitud de la misma respuesta. Un ejemplo de este diseño experimental se observa en la figura 9.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

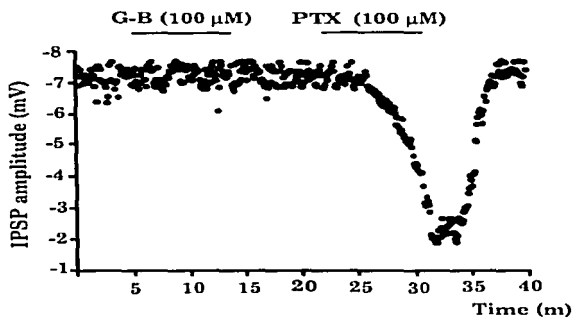


Fig. 9. En un experimento diseñado para realizar un análisis temporal de los efectos de la Galfimina-B sobre la amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores, se mostró que la adición de este compuesto natural (100 μ M) no ejerce efecto alguno sobre este parámetro fisiológico de las neuronas del AVT. Contrariamente, la adición de 100 μ M de picrotoxina, el bloqueador de canales de Cl^- del ionóforo de GABA_A -canal de Cl^- , provoca una reducción del 75% de la amplitud de este potencial.

En los registros de *patch-clamp*, una vez que la configuración de célula íntegra se alcanzaba (Fig. 10), se estabilizaba durante 10 minutos y después se adicionaba TTX (2 μ M), entonces la sesión experimental se iniciaba con el registro de las corrientes postsinápticas espontáneas en miniatura.



Fig. 10. Fotografía que muestra una neurona dopaminérgica del AVT, en una rebanada de mesencéfalo con un microelectrodo de patch-clamp asociado a su soma neuronal. La barra horizontal blanca corresponde a 10 μm .

La figura 11 muestra un registro control de estas corrientes y describe los efectos de la adición de galfimina-B sobre la frecuencia y amplitud de estas corrientes entrantes.

Durante la situación control **a**, se observó una frecuencia media de estas corrientes de 12.04 ± 0.21 Hz y una amplitud promedio de -17.7 ± 3.6 pA, además de que la duración total de las corrientes en promedio fue de 503.7 ± 68.7 μseg ($n=26$). Estos parámetros se modificaron en presencia de galfimina-B y de GABA. Después de 20 minutos de añadir al baño una concentración de 100 μM de galfimina-B, la frecuencia de las señales se redujeron significativamente a 1.97 ± 0.08 Hz ($p < 0.01$, *t* pareada); aunque no se mostró algún cambio significativo ni en la amplitud promedio de estas corrientes entrantes (-16.7 ± 2.9 pA, $p > 0.2$) ni en la duración media de las mismas

578.3 \pm 98.1 μ seg ($p > 0.32$). Estos efectos se muestran gráficamente en la porción **b** de la figura 12, mientras que en **d** se muestra la recuperación de estas corrientes 30 minutos después de eliminados los fármacos.

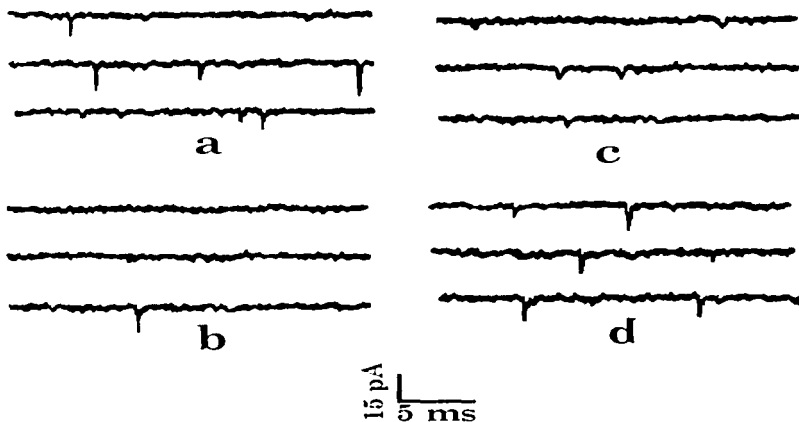


Fig. 11. Las corrientes en miniatura espontáneas excitadoras postsinápticas, representan la actividad basal de la sinapsis y la influencia que las aferentes tanto facilitadoras como inhibitoras ejercen sobre esta actividad. En este caso, la generación de espigas fue bloqueada por la adición de TTX (2 μ M). La porción a, muestra la actividad control en la que se observan corrientes entrantes, las cuales reducen su frecuencia en **b** por efecto de la administración de galpimina-B (100 μ M), y en su amplitud por la administración de GABA (10 nM). Treinta minutos después de lavada la preparación, la actividad basal se recupera notablemente, como se observa en **d**.

La administración de GABA indujo también cambios importantes sobre estas señales, sólo que con un perfil diferentes al inducido por la galfimina-B. Así, la frecuencia de las señales se redujo a 10.37 ± 1.64 Hz, lo cual no fue estadísticamente significativo ($p < 0.07$). Sin embargo, la amplitud de las señales se redujeron a -7.4 ± 1.12 pA, lo cual si corresponde a una diferencia significativa ($p < 0.01$). Además, la duración de estas señales se redujo hasta 396.8 ± 15.3 μ seg, ($p < 0.05$). Estas diferencias son el promedio de hallazgos encontrados en 22 células registradas y son esquematizadas en la porción g de la figura 11.

En otro conjunto de células ($n=28$) y una vez alcanzada la configuración de patch-clamp en modalidad de célula íntegra, se fijó el voltaje de la célula en -70 mV y se procedió a la aplicación de la estimulación eléctrica de campo. En 15 neuronas la estimulación de campo provocó un efecto tanto excitador como inhibitor de la actividad sináptica, por lo que fue necesario añadir al baño de la rebanada una concentración de 100 μ M de picrotoxina y 200 μ M de saclofen, para bloquear las respuestas inhibitoras mediadas por receptores GABA_A y GABA_B, respectivamente. En estas neuronas se analizó el efecto de la galfimina-B (1 μ M a 5 mM) sobre estas respuestas glutamatérgicas. En las restantes 13 células la influencia inhibitora fue mínima o inexistente, por lo que en ella se analizó el efecto de la administración de GABA (1 nM a 1 μ M) y de galfimina-B.

Las corrientes excitadoras postsinápticas mostraron una latencia de 3.1 ± 0.4 mseg y una amplitud pico promedio de -68.7 ± 6.7 pA. El tiempo desde el inicio de la señal al momento que alcanza su amplitud pico fue de 7.2 ± 0.9 mseg. Finalmente la duración total de estas corrientes fue de 97.9 ± 16 mseg, como se observa en la figura 12.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

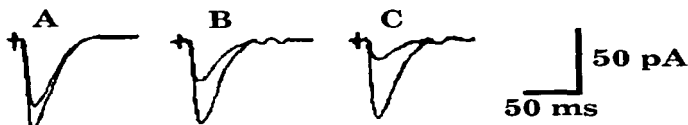


Fig. 12. Registros representativos ($n=15$, para cada concentración) de los efectos de la galfimina-B sobre las corrientes postsinápticas excitadoras inducidas por estimulación de campo en las neuronas dopaminérgicas del AVT. Se muestra el efecto inhibitor dependiente de la dosis inducido por este compuesto natural. La administración de concentraciones de 50 (A), 500 (B) y 5000 μM (C) de galfimina-B, reduce la amplitud de la corriente pico máxima en un 25.04%, 69.26% y 76.48%, respectivamente. La IC_{50} para este efecto fue calculada en 174.5 nM. El voltaje de fijación fue de -70 mV y tanto TTX ($2\mu\text{M}$), como Picrotoxina ($100\mu\text{M}$) y Saclofen ($200\mu\text{M}$) estuvieron presentes en el baño de tejidos. Es decir los bloqueadores GABAérgicos empleados no modificaron el efecto inhibitor de la galfimina-B.

Tanto la amplitud como la duración, aunque no la latencia, fueron modificados, de una forma dependiente de la dosis, por la adición de galfimina-B en varias concentraciones ($1\mu\text{M}$ a 5mM), figura 12. Empleamos en total 7 diferentes concentraciones con un mínimo de 4 aplicaciones, con lo cual elaboramos una curva concentración-respuesta que ajustada a una ecuación del tipo Hill, nos dio un valor de IC_{50} de $174.5\mu\text{M}$, y un coeficiente de Hill de 0.6 (Fig. 12).

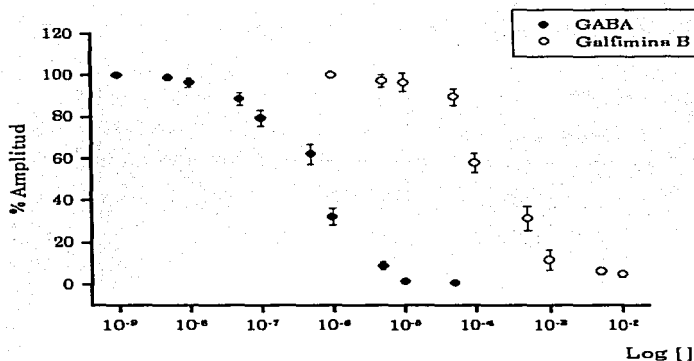


Fig. 13. La aplicación de diversas concentraciones de GABA y galfimina-B, indujeron efectos depresores de la amplitud de las corrientes excitadoras postsinápticas, las cuales fueron dosis dependientes. En esta gráfica se observa que el neurotransmisor GABA posee una mayor eficacia que la galfimina-B la cual posee una IC₅₀ de 174.5 nM; mientras que la del GABA es del orden de 645 nM.

Los efectos depresores de la galfimina-B sobre estas corrientes pueden ser analizadas en la figura 12. En ella se observa que la adición al baño de una concentración de 50, 500 y 5000 μ M, reduce la amplitud desde -68.7 ± 6.7 pA en situación control, a -51.5 ± 4.9 pA con la concentración de 50 μ M, -21.12 ± 3.1 pA durante la aplicación de 500 μ M y hasta -16.16 ± 2.8 pA para la concentración de 5000 μ M, la cual fue la concentración más alta empleada. En porcentaje estos valores representan una reducción del 25.04%, 69.26% y 76.48% del valor control, respectivamente (Fig. 12).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

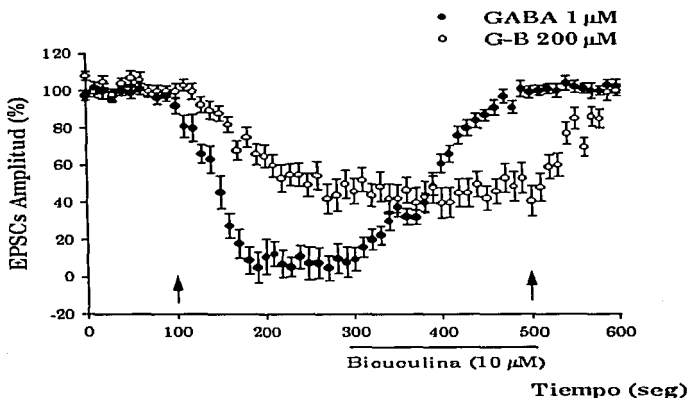


Fig. 14. Amplitud promedio ($n=13$) de las corrientes excitadoras postsinápticas inducidas eléctricamente por estimulación iterativa (0.1 Hz) desde la región rostral hacia las neuronas dopaminérgicas del AVT. Después de una fase control (100 seg) se procede a aplicar (durante el periodo señalado por ambas flechas) ya sea una concentración de GABA 1 μM o de galfimina-B (200 μM) y durante 200 segundos se añade al baño una concentración de bicuculina (10 μM , barra horizontal). Aunque ambos fármacos deprimen la amplitud de estas respuestas electrofisiológicas, la cinética del efecto es diferente. Una dosis de 1 μM de GABA provoca una reducción del 93% de la amplitud de esta señal, mientras que una dosis de 200 μM sólo reduce en un 57%.

El efecto encontrado sobre la duración total de esta respuesta eléctrica fue menos pronunciado; que su acción sobre la amplitud. Así, de 97.9 ± 16 mseg encontrados en la situación control, paso a 97.4 ± 17.2 , 89.21 ± 10.8 y 64.3 ± 9.79 mseg, con las concentraciones de 50, 500 y 5000 μM , respectivamente. Sólo la más alta concentración empleada indujo un efecto sobre la amplitud que fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

En las células restantes que mostraron predominantemente una respuesta excitadora a la estimulación de campo ($n=13$) se procedió a analizar, bajo las

mismas condiciones experimentales los efectos del GABA sobre las corrientes postsinápticas excitadoras. La estimulación eléctrica generó corrientes entrantes cuya amplitud promedio fue de -54.23 ± 8.97 pA con una latencia de 3.6 ± 0.7 mseg y una duración de 83.29 ± 16.7 mseg. Una vez caracterizadas las variables electrofisiológicas de estas células se procedió a aplicar 7 diferentes concentraciones de GABA ($n=6$ para cada concentración) las cuales oscilaron entre 1 nM y 100 μ M. La curva concentración respuesta mostró que la IC_{50} para este efecto fue de sólo 0.645 μ M con un coeficiente de Hill de 0.5 (Fig. 13). Una concentración de 100 μ M de GABA, produjo una inhibición del 97.4 % de la corriente al reducirla de -54.23 ± 8.97 a -1.4 ± 0.03 .

Aunque la dirección del efecto mostrado tanto por la galfimina-B como por el GABA es similar. Existen muchas diferencias en la cinética del efecto depresor que se manifiestan en una dinámica electrofisiológica diferente entre ambas sustancias. Estas diferencias se ilustran en los resultados de un experimento que analiza la acción temporal de ambos fármacos como se aprecia en la figura 14.

En este experimento, que analiza el efecto temporal de ambos fármacos, se normaliza la amplitud de las corrientes excitadoras postsinápticas de acuerdo al tamaño de las primeras señales, se aplica un estímulo de campo en forma repetida y constante (0.1 Hz) y después de un periodo control, en el cual la amplitud pico de la corriente se mantiene muy constante, se procede a la administración por micropresión de ambos fármacos (lo que en la figura 14 corresponde al periodo entre ambas flechas).

Finalmente, y para determinar la naturaleza del efecto observado se aplica un mensajero GABAérgico del tipo de la bicuculina, el cual es un antagonista específico de receptores tipo $GABA_A$. Los últimos 100 segundos corresponden a un periodo en el que se analiza la reversibilidad de los efectos observados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados de este experimento muestran que ambos fármacos reducen la amplitud de estas corrientes, sin embargo, la dinámica de estos efectos son diferentes. La tasa de descenso, es decir, la velocidad con que ocurre tal descenso, es mucho mayor para el GABA que para la galfimina-B. Además, el efecto máximo se alcanza mucho más pronto para el GABA que para la galfimina-B. La intensidad del efecto también es mayor para el neurotransmisor. Así, una concentración de 1 μM reduce en $96.4 \pm 6.8\%$ ($n=13$) la amplitud de esta señal; mientras que una concentración de 200 μM , de galfimina-B sólo reduce en $56.7 \pm 5.4\%$ ($n=13$) esta misma respuesta. Por otro lado, la adición de la bicuculina provocó un efecto antagonista en las acciones inducidas por el GABA, al revertir completamente su acción depresora, pero no mostró ninguna acción sobre la depresión inducida por la galfimina-B.

La amplitud de las corrientes postsinápticas regresó a sus valores controles, una vez que los fármacos fueron eliminados de la rebanada, lo que muestra que tanto los efectos inducidos por el GABA como aquellos provocados por la galfimina-B son reversibles (fig. 14).

Discusión.

Los resultados del presente estudio muestran que la galfimina-B ejerce una acción directa sobre las neuronas dopaminérgicas del AVT y que carece de efecto sobre las neuronas secundarias de esta misma región. Es importante realizar tal distinción en función de que la mayor parte de fármacos que modifican la actividad de estas neuronas lo hacen de una forma indirecta, fundamentalmente por una acción sobre mecanismos indirectos; como es el caso de los cannabinoides (69) y los opioides (39).

Otro hallazgo importante del presente estudio fue describir que este compuesto natural deprime las influencias excitadoras aferentes a las neuronas dopaminérgicas por un mecanismo presináptico de tipo no GABAérgico. Estos hallazgos sugieren el potencial farmacológico que posee este compuesto en función de la estructura neural de que se trata. Con relación al AVT, múltiples estudios lo relacionan con los estados funcionales de alerta y de integración sensorial - motora (36), de recompensa, sensaciones de bienestar (33) y por tanto de los estados motivacionales, implicando una importante participación en los mecanismos de adicción a fármacos y a reforzadores naturales como la ingesta de alimento y el sexo (28, 32).

Adicionalmente, los pocos datos que existen en la literatura sobre los efectos conductuales ejercidos por los extractos de la planta, principalmente acerca de que las infusiones de estas plantas reducían el miedo y el pánico que mostraban los soldados antes de entrar en batalla (16), se relacionan de alguna manera con algunos hallazgos reportados que señalan y enfatizan la importancia de estas neuronas dopaminérgicas en la regulación de los aspectos excitadores de la expresión al miedo y al temor. Aparentemente, tal acción resulta de modular el grado de actividad emocional dentro del sistema amigdalino del miedo (47). Tal efecto es consecuencia de una disminución en la actividad dopaminérgica del AVT, similar a los hallazgos del presente estudio, sugiriendo con ello que la modificación de la actividad de estas neuronas por la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

galfinina-B puede jugar un papel importante en las funciones que esta estructura lleva a cabo.

El AVT, posee al menos dos tipos de neuronas, las neuronas primarias o dopaminérgicas, cuyos axones liberan dopamina en sus regiones blanco tales como el núcleo accumbens (estimada como la región límbica del estriado, por lo que las conexiones entre el AVT y este núcleo son referidas como mesolímbicas) y la corteza prefrontal (cuyas proyecciones se denominan mesocorticales); y las neuronas secundarias, la mayoría de las cuales son de índole GABAérgico. Adicionalmente, la mayor parte de estas neuronas secundarias funcionan como interneuronas locales las cuales controlan el nivel de excitabilidad, y por lo tanto el disparo de las neuronas dopaminérgicas principales (53). Ambos tipos de neuronas del AVT muestran diferentes propiedades intrínsecas de membrana, diferentes conductancias y diferente sensibilidad a los variados neurotransmisores existentes y a los fármacos que utilizan el AVT como órgano blanco (27). Gracias a estas diferencias, estos tipos celulares pueden ser caracterizados tanto electrofisiológica como farmacológicamente, empleando criterios ya establecidos (76).

En el presente estudio empleamos los criterios clásicos establecidos por Johnson y North (34) para diferenciar ambos tipos de neuronas; es decir, dividimos a nuestras células en dos clases dependiendo de las tres características ya mencionadas: la presencia de una corriente I_h , por su sensibilidad a los efectos de la dopamina y si tenían una descarga espontánea tipo marcador del paso. A pesar de ser éste un criterio electrofisiológico ampliamente utilizado (66), su aceptación puede sobre simplificar enormemente la heterogeneidad poblacional del AVT, la cual contiene células que no son ni dopaminérgicas ni GABAérgicas (30). Desde un punto de vista morfológico se han descrito al menos cuatro diferentes clases de neuronas; las más abundantes (79%) son neuronas globulares de salida, las cuales son dopaminérgicas y eferentes al AVT; mientras que los tres tipos restantes son interneuronas de variadas formas

(58). las cuales manifiestan rasgos inmunocitoquímicos de varios tipos de neurotransmisores y péptidos (20) y responden a una gran diversidad de mensajeros químicos y fármacos (67).

Por todo esto, en el presente trabajo no podemos estar seguros de que todas las células que registramos y que poseían una corriente I_h fueron realmente dopaminérgicas, ni que todas las células que carecían de la misma fueron GABAérgicas. A pesar de ello, el clasificar a estas células en dos tipos nos permitió demostrar efectos farmacológicos directos sobre las propiedades sinápticas de las neuronas del AVT inducidos por este compuesto natural. Es de suponerse que si las neuronas dopaminérgicas son las más abundantes y las más grandes, nuestros registros electrofisiológicos, en función probabilística, debieron de realizarse sobre todo en este tipo de neuronas.

La mayor parte de las aferencias al área ventral tegmental son de tipo glutamatérgico, GABAérgico, colinérgicas, serotoninérgicas y noradrenérgicas (36). En relación con el control de la excitabilidad de las neuronas del AVT, las terminales glutamatérgicas parecen ser las más importantes. Estas provienen fundamentalmente de la corteza prefrontal, los núcleos subtalámicos y los núcleos tegmentales laterodorsal y pedunculopontino (70). Estas aferencias glutamatérgicas son fundamentales para determinar el tipo de descarga que las neuronas dopaminérgicas manifestarán, su influencia provoca un tipo de descarga en ráfagas con 6 a 7 potenciales de acción, que disminuyen paulatinamente de tamaño. Este tipo de actividad sólo se observa "*in vivo*" cuando estas aferencias están íntegras y desaparecen en preparaciones "*in vitro*", como la empleada en el presente estudio, donde este tipo de actividad es reemplazado por una descarga espontánea muy regular tipo marcador del paso (65).

Se postula que este tipo de descarga es fundamental en el proceso de sensibilización sináptica y por ende de la potenciación conductual, la cual es indispensable para que se desarrollen los fenómenos de adicción farmacológica

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

y conductual (11). Las descargas en ráfagas parecen además ser consecuencia de una acción del glutamato sobre todo en receptores de tipo N-metil-D-Aspartato (NMDA) (76); aunque, cuando se aplica una estimulación eléctrica en las aferentes que se dirigen al AVT, como ocurre en el caso de las preparaciones de rebanadas de cerebro, las corrientes excitadoras postsinápticas que se inducen en las neuronas dopaminérgicas, son mediadas predominantemente a través de la activación de receptores glutamatérgicos del tipo de AMPA/Kainato (ácido propiónico- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole) y en menor participación a través de la activación de receptores de tipo NMDA (76). Estudios recientes muestran además la participación de receptores metabotrópicos glutamatérgicos en los mecanismos moduladores que este neurotransmisor ejerce sobre las neuronas dopaminérgicas del AVT (68).

De forma similar, las influencias inhibitoras ejercidas por el GABA sobre estas mismas neuronas son ejercidos por dos tipos de receptores GABAérgicos, los receptores GABA_A y GABA_B, mismos que median los potenciales postsinápticos inhibidores inducidos por la estimulación eléctrica en la preparación de rebanadas de mesencéfalo (42). Las aferencias GABAérgicas de las neuronas dopaminérgicas del AVT provienen del neocortico y del globo pálido (3) y de las interneuronas intrínsecas del mesencéfalo (18). Adicionalmente, trabajos recientes muestran la presencia de neuronas GABAérgicas de salida, principalmente hacia la corteza, las cuales, aunque en pequeña proporción, ejercen una influencia importante en esta región (66).

Empleando protocolos similares a los utilizados en el presente trabajo, se observó que la aplicación al baño de GABA induce un estado de hiperpolarización, mediado por la activación de receptores tipo GABA_A y GABA_B, los primeros de los cuales generan una corriente entrante de cloro de manera directa y los segundos lo hacen al incrementar la conductancia de K⁺ por un mecanismo mediado por proteínas G_s (5).

Como puede observarse, los datos disponibles hasta ahora sugieren que la estimulación eléctrica de campo del área ventral tegmental induce una muy compleja inter-relación mutua de la modulación sináptica de los sistemas dopaminérgicos, GABAérgicos y glutamatérgicos dentro del AVT. Por lo tanto es necesaria la aplicación de bloqueadores ionotrópicos glutamatérgicos y de bloqueadores GABAérgicos para disociar las corrientes que se registran en esas células (4).

En este trabajo, y debido a las características de la preparación, no se identificó la fuente de las aferencias excitadoras estimuladas en la rebanada. Sin embargo, es posible que éstas provengan de la corteza prefrontal, debido a que esta región contribuye con la mayoría de tales aferencias a la región del área ventral tegmental (36).

El principal hallazgo del presente estudio se relaciona con la descripción de los efectos sinápticos inducidos por la galfimina-B en la neuronas dopaminérgicas del AVT. Estos efectos consisten en una reducción de tipo no GABAérgica de las entradas sinápticas excitadoras de estas células. Debido a que los estudios hasta hoy existentes de la galfimina-B muestran que este compuesto natural induce efectos similares al GABA (72, 73). Además, esta descrito que las neuronas dopaminérgicas cerebrales son en su gran mayoría reguladas por sistemas GABAérgicos, tal como ocurre en el área ventral tegmental. Las neuronas de esta zona son moduladas por fibras GABAérgicas provenientes principalmente del núcleo accumbens (71), entonces es posible sugerir que la depresión en la excitabilidad de estas neuronas observada después de la aplicación de galfimina-B, puede ser mediada a través de mecanismos que median la neurotransmisión GABAérgica. Sin embargo, los hallazgos del presente trabajo no apoyan tal sugerencia, ya que como se mostró los bloqueadores de receptores a GABA no inhiben las acciones de éste producto natural.

Se debe mencionar que es muy probable que los efectos inducidos por este compuesto natural sean de índole presináptico. Este supuesto resulta de algunos de los resultados encontrados. Así, la galfimina-B en los registros intracelulares y en presencia de bloqueadores glutamatérgicos, no modificó en nada la inhibición GABAérgica de la excitabilidad neuronal, la cual sí fue bloqueada en forma muy significativa por la adición al baño de la rebanada de picrotoxina (100 mM, Fig. 9 y 10). Además, en los experimentos de *patch-clamp* con el registro de las corrientes en miniatura espontáneas, se mostró que la galfimina-B reduce exclusivamente la frecuencia de estas señales eléctricas, las cuales son consecuencia de la actividad glutamatérgica, sin modificar la amplitud o duración de las mismas. Situación inversa al efecto inducido por la administración del GABA, el cual modifica preponderantemente la amplitud y duración de estas corrientes sin modificar la frecuencia de las mismas (Fig. 11).

Un cambio en la frecuencia de estas señales sinápticas como el observado en el presente trabajo, el cual se presenta en un corto periodo después de la administración de fármacos o neurotransmisores, es indicativo de una reducción en las descargas aferentes lo cual induce una reducción en la liberación de glutamato en la hendidura sináptica (77), lo que demuestra un efecto sobre la excitabilidad de las vías presinápticas (50). Mientras que aquellas sustancias o neurotransmisores que modifican la amplitud de estas señales ejercen efecto directo sobre la excitabilidad de la propia membrana postsináptica (48). Cuando la aplicación del fármaco se continúa durante un periodo mayor (horas o días), existen fenómenos adaptativos en los cuales la actividad postsináptica modifica en forma importante a la actividad presináptica (54).

La acción de un fármaco como la galfimina-B, además de afectar la excitabilidad de las aferentes presinápticas, altera el balance entre la excitación y la inhibición de la sinapsis. Este balance, referido como el escalamiento sináptico (*Synaptic scaling*), que constituye la piedra angular de la plasticidad sináptica. La intensidad del escalamiento recíproco entre las fuerzas inhibidores

y excitadoras sinápticas, puede también servir como un mecanismo importante que permite a las neuronas mantener un balance óptimo entre la excitación y la inhibición en la eventualidad de cambios importantes en el número o funcionalidad de las sinápsis en situaciones como el desarrollo y diferenciación, durante cambios estructurales importantes o durante la ingesta continua de fármacos o como respuesta a concentraciones cada vez más elevadas de neurotransmisores u otras sustancias (40). Como consecuencia de estas observaciones puede sugerirse que cualquier fármaco o sustancia que modifique la actividad sináptica de la manera en que la galfimina-B lo hizo, modificará la plasticidad sináptica de estas neuronas.

También los resultados obtenidos con el registro de las corrientes postsinápticas inducidas por estimulación de campo, sugieren que los efectos de la galfimina-B son presinápticos. Este compuesto natural indujo una reducción significativa de las corrientes excitadoras mediadas por terminales glutamatérgicas, efecto el cual no fue modificado por alguno de los bloqueadores GABAérgicos empleados, como lo fueron las reducciones inducidas por el GABA (Figs. 12 y 14)

En términos generales se ha sugerido que la frecuencia de descarga de las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental reflejan de alguna manera la información que posee el cerebro sobre las propiedades relevantes, ya sea de recompensa o motivacionales, que pueden poseer los estímulos externos (60). Si uno de los factores más importantes que modulan la frecuencia de descarga de estas neuronas son las aferencias glutamatérgicas provenientes sobre todo de la corteza prefrontal (80), entonces un fármaco que modifique la actividad de estas aferencias, como lo hizo la galfimina-B, inducirá efectos sobre estas conductas motivacionales o de recompensa.

En resumen, los hallazgos electrofisiológicos reportados en el presente estudio sobre los efectos inducidos por la galfimina-B, son muy interesantes a la luz de la estructura que se trata, ya que el AVT es un componente crítico de un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sistema neural que se considera es subyacente a los procesos de reforzamiento a estímulos naturales, también como a las propiedades reforzadoras de los fármacos de abuso (38). Desde un punto de vista fisiológico, los resultados encontrados, sugieren que esta sustancia natural puede ser importante para ayudar a entender los mecanismos que subyacen a la adicción, tanto a estímulos fisiológicos como farmacológicos y que tienen como sustrato al AVT, lo cual merece ser estudiado y analizado en experimentos futuros.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Conclusiones.

La galfimina-B es una sustancia de origen natural, capaz de inhibir las aferencias sinápticas excitadoras de neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental, a través de un mecanismo diferente a como lo hace el neurotransmisor inhibitor GABA.

La frecuencia de aparición de las corrientes espontáneas en miniatura, las cuales son mediadas por mecanismos glutamatérgicos, es reducida por la aplicación de galfimina-B al baño de registro.

Galfimina-B parece ser entonces, una sustancia moduladora de la transmisión sináptica en una zona donde se regula la conducta motivacional y relacionada a la recompensa, como lo es el área ventral tegmental.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Referencias.

1. **Adams FS, La Rosa FG, Kumar S, Edwards-Prasad J, Kentroti S, Vernadakis A, Freed CR, Prasad KN.** Characterization and transplantation of two neuronal cell lines with dopaminergic properties. *Neurochem Res* (1996) 21(5):619-27.
2. **Araki T, Sato M, Kiyama H, Manabe Y, Tohyama M.** Localization of GABAA-receptor gamma 2-subunit mRNA-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* (1992) 47(1):45-61.
3. **Bayer VE, Pickel VM.** GABA-labeled terminals form proportionally more synapses with dopaminergic neurons containing low densities of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in rat ventral tegmental area. *Brain Res* (1991) 559(1):44-55.
4. **Bonci A, Malenka RC.** Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J Neurosci* (1999) 19(10):3723-30.
5. **Bormann J.** The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* (2000) 21(1):16-9.
6. **Brodie MS, Appel SB.** The effects of ethanol on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area studied with intracellular recording in brain slices. *Alcohol Clin Exp Res* (1998) 22(1):236-44.
7. **Cador M, Marco N, Stinus L, Simonnet G.** Interaction between neuropeptide FF and opioids in the ventral tegmental area in the behavioral response to novelty. *Neuroscience* (2002) 110(2):309-18.
8. **Camacho-Corona, M.** Natural products against protozoal diseases. Degree thesis of Doctor of Philosophy. Faculty of Medicine of the University of London. 1997
9. **Campos MG, Toxqui E, Tortoriello J, Oropeza MV, Ponce H, Vargas MH, Montano LM.** Galphimia glauca organic fraction antagonizes LTD(4)-induced contraction in guinea pig airways. *J Ethnopharmacol* (2001) 74(1):7-15.
10. **Chio CL, Lajiness ME, Huff RM.** Activation of heterologously expressed D3 dopamine receptors: comparison with D2 dopamine receptors. *Mol Pharmacol* (1994) 45(1):51-60.
11. **Cooper D.** The significance of action potential bursting in the brain reward circuit. *Neurochem Int* (2002) 41(5):333.
12. **Dahlstrom A, Fuxe K.** Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* (1964) 20(7):398-9
13. **Di Matteo V, Cacchio M, Di Giulio C, Esposito E.** Role of serotonin receptors in the control of brain dopaminergic function. *Pharmacol Biochem Behav* (2002) 71(4):727-34.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14. **Dorsch W, Bittinger M, Kaas A, Muller A, Kreher B, Wagner H.** Antiasthmatic effects of Galphimia glauca, gallic acid, and related compounds prevent allergen- and platelet-activating factor-induced bronchial obstruction as well as bronchial hyperreactivity in guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol* (1992) 97(1):1-7
15. **Downes RP, Waddington JL.** Grooming and vacuous chewing induced by SK&F 83959, an agonist of dopamine 'D1-like' receptors that inhibits dopamine-sensitive adenylyl cyclase. *Eur J Pharmacol* (1993) 234(1):135-6.
16. **Estrada, E.** in: *Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez, Universidad Autónoma de Chapingo, Departamento de Fitotecnia, México* (1985).
17. **Fiorillo CD, Williams JT.** Glutamate mediates an inhibitory postsynaptic potential in dopamine neurons. *Nature* (1998) 394(6688):78-82.
18. **Giorgetti M, Hotsenpiller G, Froestl W, Wolf ME.** In vivo modulation of ventral tegmental area dopamine and glutamate efflux by local GABA(B) receptors is altered after repeated amphetamine treatment. *Neuroscience* (2002) 109(3):585-95.
19. **Giorgetti M, Hotsenpiller G, Ward P, Teppen T, Wolf ME.** Amphetamine-induced plasticity of AMPA receptors in the ventral tegmental area: effects on extracellular levels of dopamine and glutamate in freely moving rats. *J Neurosci* (2001) 21(16):6362-9.
20. **Glenthøj BY.** The brain dopaminergic system. *Pharmacological, behavioural and electrophysiological studies.* *Dan Med Bull* (1995) 42(1):1-21.
21. **Gorman JM.** Treatment of generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* (2002) 63 Suppl 8:17-23.
22. **Grace AA.** Evidence for the functional compartmentalization of spike generating regions of rat midbrain dopamine neurons recorded in vitro. *Brain Res* (1990) 524(1):31-4.
23. **Grace AA.** Regulation of spontaneous activity and oscillatory spike firing in rat midbrain dopamine neurons recorded in vitro. *Synapse* (1991) 7(3):221-34.
24. **Grace AA, Bunney BS.** Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience* (1983) 10(2):301-15.
25. **Grace, A.A. and Bunney, BS.** The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* (1984) 4:2866-287.
26. **Grace AA, Onn SP.** Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci* (1989) 9(10):3463-81.

27. **Grillner, P. , Mercuri N.B.** Intrinsic membrane properties and synaptic inputs regulating the firing activity of the dopamine neurons. *Behav Brain Res* (2002) 130: 149-69.
28. **Haber SN, Fudge JL.** The primate substantia nigra and VTA: integrative circuitry and function. *Crit Rev Neurobiol* (1997) 11(4):323-42.
29. **Hainsworth AH, Roper J, Kapoor R, Ashcroft FM.** Identification and electrophysiology of isolated pars compacta neurons from guinea-pig substantia nigra. *Neuroscience* (1991) 43(1):81-93.
30. **Herbert H, Klepper A, Ostwald J.** Afferent and efferent connections of the ventrolateral tegmental area in the rat. *Anat. Embryol.* (Berlin) (1997) 196: 235-59.
31. **Hobbs, W.R, Rall, T.W., and Verdoorn, T.A.** Hypnotics and Sedatives: Ethanol In: Goodman and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,(Hardman, J.G, Limbird, L.E, Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. and Gilman, A.G.,eds) TheMcGraw-Hill Companies, Inc.,(1996), pp. 379-380.
32. **Hollerman JR, Tremblay L, Schultz W.** Involvement of basal ganglia and orbitofrontal cortex in goal-directed behavior. *Prog Brain Res* (2000) 126:193-215.
33. **Horvitz JC.** Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* (2000) 96(4):651-6.
34. **Johnson SW, North RA.** Two types of neuron in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. : *J Physiol* (1992) 450: 455-68.
35. **Kalivas PW.** Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev* (1993) 18(1):75-113.
36. **Kalivas PW, Nakamura M.** Neural systems for behavioral activation and reward. *Current Opinion Neurobiol* (1999) 9: 223-7.
37. **Karler R, Calder LD, Turkanis SA.** DNQX blockade of amphetamine behavioral sensitization. *Brain Res* (1991) 552(2):295-300.
38. **Koob GF, Le Moal M.** Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* (1997) 278: 52-8.
39. **Leite-Morris KA, Fukudome EY, Kaplan GB.** Opiate-induced motor stimulation is regulated by gamma-aminobutyric acid type B receptors found in the ventral tegmental area in mice. *Neurosci Lett* (2002) 317(3):119-22.
40. **London M, Segev I** Synaptic scaling in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* (2001) 4(9):853-5.
41. **Magorrian K.** Schizophrenia. *Prof Nurse* (2002) 17(10):577-8.
42. **Maitre M.** The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol* (1997) 51: 337-61.

43. **Mercu G, Costa E, Armstrong DM, Vicini S.** Glutamate receptor subtypes mediate excitatory synaptic currents of dopamine neurons in midbrain slices. *J Neurosci* (1991) 11(5):1359-66.
44. **Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG.** Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* (1998) 78(1):189-225.
45. **Mitrovic I, Napier TC.** Mu and kappa opioid agonists modulate ventral tegmental area input to the ventral pallidum. *Eur J Neurosci* (2002) 15(2):257-68.
46. **Muller AA, Reiter SA, Heider KG, Wagner H.** Plant-derived acetophenones with antiasthmatic and anti-inflammatory properties: inhibitory effects on chemotaxis, right angle light scatter and actin polymerization of polymorphonuclear granulocytes. *Planta Med* (1999) 65(7):590-4
47. **Munro LJ, Kokkinidis L.** Infusion of quinpirole and muscimol into the ventral tegmental area inhibits fear-potentiated startle: implications for the role of dopamine in fear expression. *Brain Res* (1997) 746: 231-8.
48. **Murashima M, Hirano T.** Entire course and distinct phases of day-lasting depression of miniature EPSC amplitudes in cultured Purkinje neurons. *J Neurosci* (1999) 19(17):7326-33.
49. **Nagai T, McGeer PL, McGeer EG.** Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. *J Comp Neurol* (1983) 218(2):220-38.
50. **Neher E, Sakaba T.** Estimating transmitter release rates from postsynaptic current fluctuations. *J Neurosci* (2001) 21(24):9638-54.
51. **Oades RD, Halliday GM.** Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* (1987) 434(2):117-65)
52. **O'Dowd BF.** Structures of dopamine receptors. *J Neurochem* (1993) 60(3):804-16.
53. **Overton PG, Clark D.** Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Rev* (1997) 25: 312-34.
54. **Paradis S, Sweeney ST, Davis GW.** Homeostatic control of presynaptic release is triggered by postsynaptic membrane depolarization. *Neuron* (2001) 30(3):737-49.
55. **Petralia RS, Wenthold RJ.** Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J Comp Neurol* (1992) 318(3):329-54.
56. **Pickel VM, Chan J, Nirenberg MJ.** Region-specific targeting of dopamine D2-receptors and somatodendritic vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) within ventral tegmental area subdivisions. *Synapse* (2002) 45(2):113-24.

57. **Pin JP, Duvoisin R.** The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* (1995) 34(1):1-26
58. **Poirier LJ, Giguere M, Marchand R.** Comparative morphology of the substantia nigra and ventral tegmental area in the monkey, cat and rat. *Brain Res Bull* (1983) 11(3):371-97.
59. **Sanghera MK, Trulson ME, German DC.** Electrophysiological properties of mouse dopamine neurons: in vivo and in vitro studies. *Neuroscience* (1984) 12(3):793-801.
60. **Scott S.** Understanding the challenge of Parkinson's disease. *Nurs Stand* (2002) 16(41):48-53.
61. **Schultz W.** Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* (1998) 80:1-27.
62. **Scalfon SC, Olanow CW.** Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends Neurosci* (2000) (10 Suppl):S34-40.
63. **Seroogy KB, Danganan K, Lim S, Haycock JW, Fallon JH.** Ventral mesencephalic neurons containing both cholecystokinin- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities project to forebrain regions. *J Comp Neurol* (1989) 279(3):397-414.
64. **Smith TA.** Type A gamma-aminobutyric acid (GABA_A) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment. *Br J Biomed Sci* (2001) 58(2):111-21.
65. **Steffensen SC, Lee RS, Stobbs SH, Henriksen SJ.** Responses of ventral tegmental area GABA neurons to brain stimulation reward. *Brain Res.* (2001) 906: 190-7.
66. **Steffensen SC, Svingos AL, Pickel VM, Henriksen SJ.** Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* (1998) 18(19):8003-15.
67. **Stratta F, Bonci A, Calabresi P, Stefani A, Pisani A, Bernardi G, Mercuri NB.** Basic research in substantia nigra and ventral tegmental area: clinical implications. *J Neural Transm Suppl* (1995) 45:47-5.
68. **Swanson CJ, Kalivas PW.** Regulation of locomotor activity by metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens and ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther* (2000) 292(1):406-14.
69. **Szabo B, Siemes S, Wallmichrath I.** Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *Eur J Neurosci* (2002) 15(12):2057-61.
70. **Takahata R, Moghaddam B.** Target-specific glutamatergic regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Neurochem* (2000) 75(4):1775-8.
71. **Tanganelli S, Fuxe K, Antonelli T, O'Connor WT, Ferraro L.** Cholecystokinin/dopamine/GABA interactions in the nucleus

- accumbens: biochemical and functional correlates. Peptides (2001) 22(8):1229-34.
72. **Tortoriello J, Ortega A.** Sedative effect of galphimine B, a nor-seco-triterpenoid from *galphimia glauca*. Planta Med (1993) 59: 398-400
 73. **Tortoriello J, Ortega A, Herrera-Ruiz M, Trujillo J, Reyes-Vázquez C.** Galphimine B modifies electrical activity of ventral tegmental area neurons in rats. Planta Med. (1998) 64: 309-13.
 74. **Toscano, R.A, Ortega, A., Maldonado, E., Gaviño, R., Lozoya, X., Tortoriello, J.** Structure of Galphimine-B. Acta Crystallogr. (1993) C49: 774-6.
 75. **Treiman DM.** GABAergic mechanisms in epilepsy. Epilepsia (2001) 42 Suppl 3:8-12.
 76. **Tzschentke TM.** Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. Prog. Neurobiol. (2001) 63: 241-320.
 77. **Umemiya M, Senda M, Murphy TH.** Behaviour of NMDA and AMPA receptor-mediated miniature EPSCs at rat cortical neuron synapses identified by calcium imaging. J Physiol (1999) 521 Pt 1:113-22.
 78. **Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A.** Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. Nature (2001) 411(6837):583-7.
 79. **Waszczak BL, Bergstrom DA, Walters JR.** Single unit responses of substantia nigra and globus pallidus neurons to GABA agonist and antagonist drugs. Adv Biochem Psychopharmacol (1981) 30:79-94.
 80. **Wise RA.** Interactions between medial prefrontal cortex and meso-limbic components of brain reward circuitry. Prog Brain Res (2000) 126:255-62.
 81. **Yim CC, Mogenson GJ.** Electrophysiological evidence of modulatory interaction between dopamine and cholecystokinin in the nucleus accumbens. Brain Res (1991) 541(1):12-20.
 82. **Zhou Q, Nyberg F.** Injection of substance P (SP) N-terminal fragment SP(1-7) into the ventral tegmental area modulates the levels of nucleus accumbens dopamine and dihydroxyphenylacetic acid in male rats during morphine withdrawal Neurosci Lett (2002) 320(3):117-20.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN