

Curso 1995/96
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

MARIA DEL CARMEN DAMAS HERNÁNDEZ

**Influencias ipsilaterales y contralaterales
del núcleo tegmental pedúnculo-pontino
sobre la actividad electrofisiológica
de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales**

Director
MANUEL RODRÍGUEZ DÍAZ



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

INDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------|----|
| • INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. DOPAMINA..... | 3 |
| 1.1. Biosíntesis | 4 |
| 1.2. Almacenamiento, Liberación e Inactivación | 5 |
| 2. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS..... | 6 |
| 2.1. Subfamilia de receptores D ₁ | 7 |
| 2.1.1. Receptor D ₁ | 7 |
| 2.1.2. Receptor D ₅ | 9 |
| 2.2. Subfamilia de receptores D ₂ | 10 |
| 2.1. Receptores D _{2S} y D _{2L} | 10 |
| 2.2. Receptor D ₃ | 11 |
| 2.3. Receptor D ₄ | 12 |
| 3. DISTRIBUCIÓN DE LOS SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS EN EL CEREBRO | 13 |
| 3.1. Núcleos mesencefálicos y proyecciones..... | 14 |
| 3.1.1. Sistema mesoestriatal | 15 |
| 3.1.2. Sistema mesolimbocortical | 16 |
| 3.1.3. Sistema mesodiencefálico | 16 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.4. Proyecciones dentro del mesencéfalo..... | 17 |
| 3.1.5. Proyecciones descendentes | 17 |
| 3.2. Núcleos dopaminérgicos del prosencéfalo | 18 |
| 4. NEURONAS DOPAMINÉRGICAS NIGROESTRIATALES | 18 |
| 4.1. Anatomía y citoarquitectura de la sustancia negra | 19 |
| 4.1.1. Pars Compacta | 19 |
| 4.1.2. Pars Reticulata | 20 |
| 4.1.3. Pars Lateralis..... | 21 |
| 4.2. Identificación electrofisiológica..... | 22 |
| 4.3. Propiedades electrofisiológicas básicas..... | 26 |
| 4.3.1. Características bioeléctricas..... | 26 |
| 4.3.2. Actividad espontánea..... | 27 |
| 4.3.3. Patrón de descarga..... | 28 |
| 4.3.3.1. Patrón de descarga en forma de espiga simple..... | 29 |
| 4.3.3.2. Patrón de descarga en ráfagas..... | 30 |
| 4.3.4. Registros intracelulares <i>in vitro</i> | 32 |
| 4.4. Regulación de la actividad electrofisiológica de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales..... | 33 |
| 4.4.1. Autorregulación por liberación de dopamina en la SN..... | 33 |
| 4.4.2. Regulación por neuronas dopaminérgicas vecinas..... | 35 |
| 4.4.3. Regulación por células no dopaminérgicas de la SNr..... | 36 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4.4. Regulación por células no nigrales: aferencias a la sustancia negra | 38 |
| 4.4.4.1. Vía córtico-nigral..... | 38 |
| 4.4.4.2. Vía estriatonigral..... | 39 |
| 4.4.4.3. Vía pálido-igral..... | 42 |
| 4.4.4.4. Vía subtálamo-nigral..... | 43 |
| 4.4.4.5. Vía rafe-nigral..... | 44 |
| 4.4.4.6. Vía locus coeruleus-nigral | 45 |
| 4.4.5. Control dopaminérgico de las aferencias y eferencias nigrales..... | 45 |
| 4.4.6. Interdependencia entre los dos sistemas dopaminérgicos nigroestriatales..... | 47 |
| 5. NÚCLEO TEGMENTAL PEDÚNCULO-PONTINO | 48 |
| 5.1. Citoarquitectura..... | 48 |
| 5.2. Descripción citológica..... | 50 |
| 5.3. Citoquímica del PPN..... | 51 |
| 5.4. Características electrofisiológicas..... | 51 |
| 5.5. Aferencias al PPN | 52 |
| 5.5.1. Aferencias desde el cerebro anterior..... | 53 |
| 5.5.2. Aferencias desde el cerebro medio..... | 54 |
| 5.5.3. Aferencias desde el cerebro posterior..... | 55 |

| | |
|-----------------------------------------------------|----|
| 5.6. Eferencias..... | 55 |
| 5.6.1. Eferencias descendentes..... | 56 |
| 5.6.2. Eferencias ascendentes | 56 |
| 5.6.2.1. Eferencias al cerebro anterior..... | 56 |
| 5.6.2.2. Eferencias al cerebro medio..... | 57 |
| 5.7. Influencia del PPN sobre la SN..... | 59 |
| 5.8. Procesos en los que está implicado en PPN..... | 60 |

• **MATERIAL Y MÉTODO**

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. ANIMALES Y AMBIENTE | 62 |
| 2. REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EXTRACELULAR..... | 62 |
| 2.1. Preparación del animal para el registro electrofisiológico | 62 |
| 2.2. Localización e identificación de las neuronas dopaminérgicas..... | 64 |
| 2.3. Registro electrofisiológico de la actividad de las neuronas dopa- minérgicas nigroestriatales..... | 65 |
| 3. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DEL REGISTRO REALIZADO..... | 70 |
| 4. MÉTODOS HISTOLÓGICOS | 70 |
| 4.1. Congelación y corte del tejido | 71 |
| 4.2. Tinción | 72 |

C EXPERIMENTOS

1. EXPERIMENTO 1:

Efecto de la hemitransección anterior o posterior a la sustancia negra sobre la actividad espontánea de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales.

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Objetivos | 73 |
| 1.2. Material y método | 74 |
| 1.2.1. Diseño experimental | 74 |
| 1.2.2. Sujetos experimentales y procedimiento para las hemitransecciones..... | 86 |
| 1.2.3. Análisis estadístico..... | 76 |
| 1.3.Resultados..... | 78 |
| 1.3.1. Características electrofisiológicas de las neuronas registradas..... | 78 |
| 1.3.2. Estudio de la actividad espontánea..... | 81 |
| 1.4.Discusión | 90 |

2. EXPERIMENTO 2: Respuestas de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales a la estimulación eléctrica del núcleo pedúnculo-pontino ipsilateral.

| | |
|-----------------------------------------|----|
| 2.1. Objetivos..... | 95 |
| 2.2. Material y método | 96 |
| 2.2.1. Diseño experimental | 96 |
| 2.2.2. Sujetos experimentales | 97 |
| 2.2.3. Procedimiento experimental | 98 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.2.4. Análisis estadístico | 98 |
| 2.3. RESULTADOS | 99 |
| 2.3.1. Histogramas periestímulo | 99 |
| 2.3.2. Actividad espontánea de las NSDA y respuestas a la estimulación del PPN | 107 |
| 2.4. Discusión | 114 |
| | |
| 3. EXPERIMENTO 3: Efectos sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales de la estimulación eléctrica del núcleo pedúnculo-pontino contralateral. | |
| 3.1. Objetivos..... | 118 |
| 3.2. Material y método | 119 |
| 3.2.1. Diseño experimental | 119 |
| 3.2.2. Sujetos experimentales | 120 |
| 3.2.3. Procedimiento experimental | 120 |
| 3.2.4. Análisis estadístico | 121 |
| 3.3. Resultados..... | 121 |
| 3.3.1. Histogramas periestímulo | 121 |
| 3.3.2. Comparación de los resultados obtenidos tras la estimulación de PPN ipsilateral con los del contralateral..... | 146 |
| 3.4. Discusión | 146 |
| | |
| 4. EXPERIMENTO 4: Efecto sobre la actividad electrofisiológica de las neuronas NSDA de la estimulación eléctrica de los núcleos pedúnculo-pontinos ipsi y | |

contralateral tras su lesión

| | |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1. Objetivos | 139 |
| 4.2. Material y método | 140 |
| 4.2.1. Diseño experimental | 140 |
| 4.2.2. Sujetos experimentales y procedimiento para las lesiones..... | 141 |
| 4.2.3. Análisis estadístico | 142 |
| 4.3. Resultados: Histogramas periestímulo | 142 |
| 4.4. Discusión | 155 |
| • DISCUSIÓN FINAL | 157 |
| • CONCLUSIONES | 161 |
| • BIBLIOGRAFÍA | 63 |

En 1889, se acaba definitivamente con los postulados reticularistas de la época según los cuales las células nerviosas estaban unidas físicamente por una red continua que permitía un flujo, sin dirección fija, entre ellas. En el Congreso de la Sociedad Anatómica Alemana de ese año Ramón y Cajal muestra, con preparaciones histológicas, que las células nerviosas son físicamente independientes y que constituyen las unidades morfofuncionales del sistema nervioso. Según Cajal, una de las prolongaciones de las células nerviosas, el axón, se prolonga hasta las dendritas o soma de otras células sin llegar a unirse con ellas. Estas conclusiones, que determinarían el gran desarrollo de la neurociencia hasta nuestros días, fueron confirmadas, ya bien entrado el presente siglo, con el microscopio electrónico.

En 1890, Waldeyer daría el nombre de neuronas a estas células nerviosas y Sherrington, en 1897, llamaría sinapsis al lugar de actuación de una neurona sobre otra.

Esta nueva concepción del sistema nervioso no tardó en despertar la curiosidad de los científicos por conocer lo que sucede entre el elemento distal del axón y la neurona siguiente para que la comunicación entre neuronas pueda superar la separación física que supone la sinapsis. En un principio, se consideró que el final del axón podría alterar a las células postsinápticas mediante un fenómeno de inducción eléctrica. No obstante, poco a poco se fueron obteniendo evidencias que indicaban la existencia de sustancias neurotransmisoras en el sistema nervioso periférico y, posteriormente, en el central.

La primera demostración sólida de la existencia de sustancias neurotransmisoras la obtuvo Otto Loewi en 1912. Sus experimentos le llevaron a concluir que la estimulación eléctrica del nervio vago, provocaba que éste liberara una sustancia al medio responsable de las acciones fisiológicas del mismo. Estos experimentos hicieron que se aceptara, definitivamente, la teoría química de la transmisión nerviosa y despertaron un amplio interés por encontrar esas sustancias.

El biólogo Henry Dale y sus colaboradores, entre los años 1929-1936, aislaron la acetilcolina de los nervios motores y demostraron que era

liberada cuando se aplicaban estímulos eléctricos sobre estos nervios y que su acción era finalizada por inactivación enzimática. Ulf von Euler en la década de 1940 descubrió que la noradrenalina era un neurotransmisor de los nervios simpáticos. Desde entonces la lista de neurotransmisores se ha ido incrementando y localizando en el sistema nervioso central, definiendo las moléculas receptoras para cada neurotransmisor así como los mecanismos de inactivación, tarea que continúa en la actualidad.

Simultáneamente a los descubrimientos que se realizaban en el estudio de la sinapsis química, otros investigadores empezaron a aclarar los mecanismos de los impulsos nerviosos y la acción de las sustancias transmisoras sobre la actividad bioeléctrica.

Entre 1939 y 1951, A.L. Hodgkin, A.F. Huxley y B. Katz realizaron con éxito experimentos con el axón gigante de calamar y fueron capaces de registrar el potencial de reposo y los potenciales de acción, la participación de los iones sodio y potasio en estos fenómenos, así como, los mecanismo de la conducción axónica del potencial de acción.

John C. Eccles, L.G. Brock y J.S. Coombs, en 1951, comenzaron a registrar, mediante técnicas intracelulares, la actividad bioeléctrica de neuronas del sistema nervioso central de mamífero. De este modo, comenzaron a estudiar los efectos de las aferencias sobre la actividad eléctrica, apareciendo los conceptos de potenciales postsinápticos excitadores e inhibidores, valor umbral y sumación de potenciales postsinápticos. Fue así como, el estudio de las aferencias y el efecto de las sustancias transmisoras sobre la actividad bioeléctrica neuronal comenzó a ser un campo de intensa investigación. Eccles y col. lograron unificar los conceptos bioquímicos, bioeléctricos e histológicos, y avanzaban en el modelo propuesto por Ramón y Cajal. A partir de estos trabajos, adquirió mucha fuerza la idea de que el conjunto de nuestro cerebro está lleno de redes complejas de neuronas que se influyen mediante sinapsis excitadoras e inhibidoras.

En la presente Tesis Doctoral se comparará el posible efecto sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales de aferencias originadas en el cerebro anterior con respecto a las originadas en el cerebro posterior. Posteriormente, vamos a concretar nuestro estudio

sobre las aferencias procedentes del cerebro posterior, de la región del núcleo pedúnculo pontino tanto ipsilaterales como contralaterales, con el fin de avanzar en el conocimiento de los mecanismos que regulan la actividad de estas neuronas.

1. DOPAMINA

Desde su descubrimiento en 1939 (Vogt, 1954; Dahlström y Fuxe, 1964) y hasta los años cincuenta, la dopamina (DA, 3,4-dihidroxifeniletilamina) se había considerado como un metabolito intermedio de la síntesis de otras catecolaminas como la noradrenalina (NA). En 1958, Carlsson y colaboradores encontraron altas concentraciones de dopamina en el estriado, y, en 1959, Bertler y Rosengren comprobaron que no se correspondían con las bajas concentraciones de NA existentes en esa estructura. Ese mismo año, Carlsson y colaboradores, proponen que la DA es un neurotransmisor implicado en funciones motoras extrapiramidales.

Se puede considerar que el desencadenante de la intensa investigación que han sufrido estos sistemas desde entonces, fue el descubrimiento por parte de Ehringer y Hornykiewicz (1960) de que las concentraciones de DA en los ganglios basales de pacientes parkinsonianos estaban reducidas. Por otra parte, el descubrimiento de que tanto la DA como las otras catecolaminas podían visualizarse microscópicamente mediante el uso de técnicas histoquímicas de fluorescencia (Dahlström y Fuxe, 1964) permitió la localización anatómica precisa de las poblaciones neuronales dopaminérgicas, facilitándose su estudio.

Muchas teorías actuales, consideran que las bases biológicas de diferentes desórdenes neurológicos y psiquiátricos en humanos, están relacionadas con disfunciones de los sistemas dopaminérgicos. Por ejemplo, se ha propuesto que en la esquizofrenia existe una hiperactividad de estos sistemas neurales en el cerebro (Bowers, 1973, Snyder, 1972; Carlsson, 1988, Meltzer, 1988; Carlsson y Suenenson, 1990; Davis y col., 1991; Goldstein y Deutch, 1992; Grace, 1991, 1992, 1993; Reynolds, 1992; Riederer y col., 1992; Tassin, 1992; Ellison, 1994), así como en el

síndrome de Tourette (Van Woert y col., 1976; Surwillo y col., 1987), mientras que, el hipofuncionamiento del sistema dopaminérgico nigroestriatal consecuencia de la acelerada pérdida de neuronas da lugar a la enfermedad de Parkinson (Ehringer y Hornykiewicz, 1960; Hornykiewicz, 1963, 1966; Calne, 1970).

1.1. BIOSÍNTESIS

La biosíntesis de DA, se realiza a partir del aminoácido L-tirosina que atraviesa la barrera hematoencefálica por un sistema de transporte selectivo para aminoácidos neutros (Wurtman y col., 1974; Gibson y col., 1982).

La L-tirosina es hidroxilada para formar 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). Esta reacción está catalizada por la tirosina hidroxilasa (TH), que además de tirosina, utiliza oxígeno molecular, iones ferrosos y el cofactor tetrahidrobiopterina (TBH) (Nagatsu, Levitt y Underfriend, 1964). Bajo condiciones fisiológicas normales las concentraciones de L-tirosina parecen saturar completamente a la enzima (Murrin, Morgenroth y Roth, 1976). No obstante, la biodisponibilidad de L-tirosina puede ser un factor limitante en aquellos casos en que el "turnover" de dopamina está incrementado (lesión parcial del sistema nigroestriatal, tratamiento con neurolépticos, ...) (Sally, Ulus y Wurtman, 1977; Carlsson y Lindqvist, 1978; Wurtman y col., 1979) y también en cerebros inmaduros en el último tercio del desarrollo embrionario (Arévalo, 1985).

El cofactor pteridínico está en concentraciones subsaturantes para la enzima, por lo que podría jugar un papel importante en la regulación de la actividad de ésta. Así, la administración intraventricular de TBH aumenta drásticamente la actividad de la TH (Ikeda, Fahien y Underfriend, 1966).

A corto plazo la TH está controlada por el producto final (DOPA, DA) que ejerce una inhibición retrógrada sobre la enzima.

La segunda etapa de la síntesis de DA es la descarboxilación de la L-DOPA por la dopa descarboxilasa (DD), una enzima que precisa de piridoxal-5'-fosfato (Duncan y Sourkes, 1978), para dar lugar a la DA. La L-DOPA se encuentra en concentraciones muy bajas en el sistema nervioso central, debido a la alta actividad de la DD en relación a la TH (Fuxe y col., 1978). La DD no es específica para la L-DOPA, sino que también actúa sobre otros aminoácidos aromáticos, por lo que también se la conoce como aminoácido aromático descarboxilasa (Masserato y col., 1989).

1.2. ALMACENAMIENTO, LIBERACIÓN E INACTIVACIÓN

Una vez sintetizada, la DA puede ser almacenada en vesículas sinápticas (Aghajanian y Bloom, 1966; Richards y Tranzer, 1970) o sufrir un tipo de almacenamiento no vesicular (Glowiskie e Iversen, 1966; Sotelo, 1975).

El mecanismo de liberación de la DA procedente de vesículas, parece ser por exocitosis calcio dependiente. No obstante, teniendo en cuenta que no toda la DA es almacenada en vesículas, cabría esperar otro tipo de almacenamiento y liberación. En este sentido, se ha observado que el tratamiento con reserpina, que impide el almacenamiento vesicular, no disminuye (incluso puede elevar) la liberación basal de DA, ni la inducida por amfetamina (Parker y Cubeddu, 1986). En este sentido, se ha encontrado, en preparaciones de estriado *in vitro*, un tipo de liberación de DA^[3H] no dependiente de calcio sino de un transportador específico sobre los que actúan la serotonina (5-HT) o agonistas (5-HT₃), modulando la liberación de DA (Nurse y col., 1988; Schmidt y Black, 1989; Yi y col., 1991; Benuck y Reith, 1992; Jacocks y Cox, 1992; Richtter y col., 1995).

El mayor determinante de la liberación de DA, es el flujo de impulsos. La estimulación eléctrica de somas o axones dopaminérgicos,

produce un aumento exponencial de liberación dependiente de la frecuencia de estimulación (Gonon y Buda, 1985; Wightman y Zimmerman, 1990).

Una vez liberada la DA puede alcanzar los receptores. Tras la activación de los receptores bien por su catabolización a 3-metoxitiramina (3MT), en la propia hendidura sináptica, por acción de la catecol-o-metil-transferasa (COMT), o bien por la recaptación al botón terminal cotransportándose con iones sodio y cloro (Krueger, B.K. 1990; McElvain, J.S. y Schenk, J.O., 1992) mediante un transportador específico al que se conoce como receptor de la cocaína (Ritz y col.,1987; Edvardsen y Dahl, 1994). Una vez recaptada, la DA es almacenada para su reutilización o es degradada por acción de la monoaminoxidasa (MAO), una enzima ligada a la membrana mitocondrial, produciéndose ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC). Tanto el DOPAC como la 3-MT pueden catabolizarse a ácido homovalínico (HVA) por acción de la COMT o de la MAO, respectivamente (Westerink, 1979).

2. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

La primera intuición de que la dopamina ejerce su efecto actuando sobre receptores, la tuvo el farmacólogo sueco Arvid Carlsson en 1963, tras observar el efecto de los neurolépticos sobre los metabolitos de la dopamina. Fue en 1975, utilizando las mismas técnicas con que se había logrado establecer la presencia de receptores opiáceos, cuando se consiguió identificar por primera vez receptores de DA de un modo directo (Creese y Burt, 1975). No obstante, los resultados obtenidos diferían dependiendo del método empleado, lo que llevó, años después, a la conclusión de que la población de receptores dopaminérgicos no es homogénea (Kebabian y Calne, 1979; Seeman, 1980; Stoof y Kebabian, 1984). Desde entonces, distintos autores han realizado diferentes clasificaciones de los receptores de dopamina. De estas clasificaciones, la

más aceptada hasta hace poco ha sido la propuesta por Keabian y Calne en 1979, quienes distinguían dos tipos de receptores dopaminérgicos: los D₁ y los D₂. Los receptores D₁ serían aquellos que, acoplados a un sistema adenilato ciclasa, estimulan la producción de AMPc (Nathanson, 1977). Los receptores D₂ no estarían acoplados a este sistema de segundo mensajero. A su vez, ambos tipos de receptores también se diferenciarían en su afinidad por la DA y por los agonistas y antagonistas dopaminérgicos. Stoof y Keabian (1984), introdujeron una modificación a esta clasificación, de manera que los receptores D₁ tendrían una acción estimuladora sobre la actividad de la adenilato ciclasa, y los receptores D₂ podrían estar o no asociados a esta enzima y, en caso de estarlo, inhibirían su actividad.

Actualmente, mediante el uso de técnicas de ADN recombinante, se han clonado cinco subtipos de receptores dopaminérgicos que presentan diferencias farmacológicas. Todos estos subtipos, en base a su funcionalidad, estructura, farmacología y distribución, se incluyen dentro de una de las dos categorías de receptores reconocidas inicialmente (D₁ ó D₂).

2.1. SUBFAMILIA DE RECEPTORES D₁

2.1.1. RECEPTORES D₁.

En 1990, grupos de cuatro laboratorios, simultáneamente, informaron del clonaje de los ADNc y/o de los genes que codifican a un receptor para la DA, como el caso de los D₁ que activa la adenil ciclasa, tanto en tejido de rata como en tejido humano (Monsma y col., 1990; Dearry y col., 1990; Zhou y col., 1990; Sunahara y col., 1990). Se trata de una glicoproteína de 446 aminoácidos con características estructurales y de situación topográfica propuesta en la membrana, semejante a

la de receptores acoplados a la proteína G_s . En humanos, el gen que codifica este receptor, se encuentra en el cromosoma 5 (Sunahara y col., 1990). También se les denomina D_{1A} o $D_{1\alpha}$.

Se ha demostrado la unión saturable y de alta afinidad del antagonista selectivo para los receptores D_1 el [3H]SCH23390 ó el [^{125}I]SCH23982 (Monsma y col., 1990; Dearry y col., 1990; Zhou y col., 1990; Sunahara y col., 1990). Los receptores D_1 presentan un acoplamiento positivo a la actividad adenil ciclasa (Dearry y col., 1990), por lo que la unión de DA a receptores D_1 aumenta los niveles de AMPc (Monsma y col., 1990; Zhou y col., 1990).

Su distribución tisular, hallada mediante histoquímica de hibridación *in situ* (Gerfen y col., 1990; Monsma y col., 1990; Dearry y col., 1990; Zhou y col., 1990; Sunahara y col., 1990; Weiner y col., 1990; Sunahara y col., 1990; Fremeau y col., 1991; Le Moine y col., 1991; Mengod y col., 1991) y mediante la utilización de anticuerpo antipeptido generado a partir de la secuencia del receptor (Ariano y Sibley, 1994), correlaciona bien con la información previa de la actividad adenil ciclasa estimulada por DA. Se encuentra en el caudado-putamen, en el núcleo accumbens, en el tubérculo olfatorio, en el córtex cerebral, en el sistema límbico, en el tálamo y en el hipotálamo; y en menor cantidad en la sustancia negra.

En el estriado se encuentran el 50% de las neuronas medianas (Gerfen y col., 1990; Weiner y col., 1991). Hay evidencias que indican que la mayoría de estas neuronas sintetizan sustancia P y reciben proyecciones del sistema dopaminérgico nigroestriatal (Gerfen y col., 1990; Le Moine y col., 1991). Una pequeña cantidad de neuronas largas de esta estructura también expresan algunos niveles de receptores D_1 (Le Moine y col., 1991). Por otra parte, según han mostrado Ariano y Sibley (1994), se expresa en el 80% de las neuronas estriónígricas.

La distribución del ARNm coincide bastante con la de los sitios de unión, a excepción de la sustancia negra, donde existe una considerable unión a los D_1 , pero en cambio generalmente no se detecta expresión de su ARNm. Esto podría deberse a que el receptor no sea sintetizado en la sustancia negra, sino que

sea transportado a ella desde el estriado (Jackson y Westlind-Danielson, 1994).

2.1.2. RECEPTOR D₅.

El receptor D₅ (nomenclatura alternativa: D_{1B}, D_{1S}) es un segundo miembro de la subfamilia de receptores D₁, que ha sido clonado por Sunahara y col. en 1991. Es una proteína de 477 aminoácidos con una gran homología con el receptor D₁. Las uniones de diferentes agonistas y antagonistas a los receptores D₁ y D₅, son similares, con una notable excepción para la DA, que es unas diez veces más potente sobre los receptores D₅ que sobre los D₁ (Sunahara y col., 1991).

En general, el nivel de expresión del receptor D₅ es mucho menor que los del D₁. Se expresa en gran cantidad en el hipocampo, en el hipotálamo, y en menor cuantía en el estriado y en el córtex frontal (Fremeau y col., 1991).

El homólogo del receptor D₅ -en rata- también ha sido clonado y se le denomina D_{1B} (Tiberi y col., 1991; Monsma y col., 1991). Su farmacología es similar a la del D₁, incluyendo su alta afinidad por la DA. Su distribución también es similar: hipocampo, hipotálamo, plexos coroideos, cortex cerebral, pequeñas o ninguna cantidad en el estriado y grandes cantidades en el núcleo pretectal y en los mamilares (Huntley y col., 1992; Sunahara y col., 1991; Weinshank y col., 1991). El gen para este receptor -en humanos- se encuentra en el brazo pequeño del cromosoma 4 (Tiberi y col., 1991). De interés es el hecho de que esta misma región cromosomal contiene un gen implicado en la enfermedad de Huntington (Jackson y Westlind-Danielson, 1994).

Al igual que los D₁, los receptores D₅ se acoplan directamente al sistema de la adenilciclasa (Tiberi y col., 1991), induciendo

la producción de AMPc en cantidades dependientes de la concentración del agonista utilizado (Grandy y col., 1991; Sunahara y col., 1991; Weinshank y col., 1991).

2.2. SUBFAMILIA DE RECEPTORES D₂

2.2.1. RECEPTORES D_{2S} Y D_{2L}.

Han sido los primeros receptores clonados, tanto en humanos (Bunzow y col., 1988), como en rata (Storman y col., 1990). Es una glicoproteína con características estructurales semejantes a la de otros receptores acoplados a proteína G (Dohlman y col. 1991). Análisis cromosómicos han indicado que el gen de este receptor se encuentra en el cromosoma 11 (Grandy y col., 1989).

Las áreas cerebrales con mayor expresión de su ARNm, se corresponden con aquéllas con más proyecciones dopaminérgicas (Palacios y Pazos, 1987; Bunzow y col., 1988; Meador-Woodruff y col., 1989; Mengod y col., 1989; Stormann y col., 1990; Mansour y col., 1990; Weiner y col., 1990): caudado-putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, región septal, amígdala, núcleos mamilares, córtex cingular y frontal (láminas V y VI respectivamente). También se encuentra en los cuerpos celulares de la sustancia negra compacta y en el área tegmental ventral. En el estriado, se encuentra en el 50% de las células de tamaño medio, y en algunas células alargadas, la mayoría de las cuales parecen ser neuronas colinérgicas (Le Moine y col., 1990; McVittie y col., 1991).

Poco después del clonaje del receptor D₂, se determinó que existen dos isoformas, la D_{2S} (nomenclatura alternativa: D₂₄₁₅, D_{2B}, D_{2short}, D_{2A-S}) y la D_{2L} (nomenclatura alternativa: D₂₄₄₄, D_{2A},

D_{2long}, D_{2L-A}), que difieren en un segmento de 29 aminoácidos y que proceden del mismo gen. Ambas isoformas se encuentran en tejido humano, de rata, bovino y en el de ratón, en todas las regiones donde se expresa el receptor D₂ (O'Malley y col., 1990; McLennan y col., 1990; Gandelman y col., 1991; Mack y col., 1991; Snyder y col., 1991; Neve y col., 1991; Le Moine y col., 1991). Ambas isoformas inhiben a la adenilil ciclasa (Weiner y Brann, 1989; Rinaudo y col., 1990), modulan las corrientes de potasio (K⁺) (Eihorn y col., 1990; Castellano y col., 1993), potencian la liberación de ácido araquidónico (Kanterman y col., 1991), la hidrólisis de fosfatidil inositol e incrementan las concentraciones de calcio intracelular (Liu, Y.F. y col., 1992b; Vallar y col., 1990). No obstante, hay que tener en cuenta que el acoplamiento receptor-efector no depende sólo de las características estructurales del receptor, sino también de las características de la célula en la que se exprese (Vallar y col., 1990). Los receptores D₂ se encuentran acoplados a una proteína G_i o a una proteína G_o (Albert y col., 1990; Bates y col., 1991; Hayes y col., 1992; Kanterman y col., 1991; Liu, Y.F. y col., 1992; Neve y col., 1989; Vallar y col., 1990).

2.2.2. RECEPTOR D₃

Sokoloff y col. (1990) clonaron el gen de otro receptor que codifica una proteína de 446 aminoácidos. Se le llamó receptor D₃, y tanto su secuencia de aminoácidos como su situación propuesta en la membrana, es semejante a la del receptor D₂. Su distribución es menos abundante y más restringida que la del receptor D₂. Se expresa predominantemente en el sistema límbico (tubérculo olfatorio, núcleo accumbens, islas de Calleja e hipotálamo) y en menor cantidad en el caudado-putamen y en ciertas zonas corticales. También se encuentra en la sustancia negra, donde puede servir de autorreceptor, o poseer alguna función presináptica que hasta ahora se le había atribuido a los receptores D₂ (Sokoloff y col., 1990). También se encuentra en el 65% de las neuronas estriónígricas, junto con los receptores

D₂ y D₁ (Ariano A. Y Sibley D.R., 1994).

No se han observado efectos de los receptores D₃ sobre la actividad de la adenilato ciclasa (SoKoloff y col., 1990), pero sí sobre la extrusión de H⁺ (H. Erikson y G. Karlsson, comunicación personal a Jackson y Westlind-Danielson, 1994).

El gen de este receptor en humanos se encuentra en el cromosoma 3 (Giros y col., 1991).

2.2.3. RECEPTOR D₄

Es el último de los receptores que ha sido clonado dentro de la subfamilia de los receptores D₂ (Van Tol y col., 1991; O'Malley y col., 1992). Se trata de una proteína de 387 aminoácidos, con estructura y topografía en la membrana similar a los D₂ y D₃, en el 41% y 39%, respectivamente. Su gen, al igual que el del D₂, se halla en el cromosoma 11 (Van Tol y col., 1991).

En general, el receptor D₄ posee afinidades similares o menores que los receptores D₂ y D₃ para los agonistas y antagonistas de receptores dopaminérgicos. De gran importancia es el hecho de que el antipsicótico atípico clozapina y su congénere cloretepina, exhiben una afinidad aproximadamente diez veces mayor para los receptores D₄. La interacción de la dopamina con este receptor es sensible a los nucleótidos de guanina, indicando que, efectivamente, el receptor está acoplado a la proteína G (Van Tol y col., 1991; Mills y col., 1993). La activación de los receptores D₄ produce inhibición de la adenilciclasa (Tang y col., 1994), o de la acumulación de AMPc (Cohen y col., 1992; Chio y col., 1994a).

Al igual que el D₃, parece que este receptor se expresa en menor cantidad que los D₂. Las áreas donde es más abundante son: el córtex frontal, el cerebro medio, la amígdala y la médula. Se encuentran niveles bajos en el estriado, en el tubérculo olfatorio y en el cerebelo (Van Tol y col., 1991).

3. DISTRIBUCIÓN DE LOS SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS EN EL CEREBRO

La primera descripción de la localización de los cuerpos neuronales dopaminérgicos, fue realizada por Dahlström y Fuxe en 1964. Estos autores por la falta de relación directa entre estructuras anatómicas y los centros dopaminérgicos, utilizaron una nueva nomenclatura para designar las distintas agrupaciones neuronales. Los centros fueron etiquetados con la inicial "A" y un número indicativo de cada grupo. Las etiquetas A1-A7 fueron asignadas a los centros noradrenérgicos y a partir de A8 a los grupos celulares dopaminérgicos.

Las células dopaminérgicas se encuentran localizadas en el mesencéfalo y, en menor medida, en el diencéfalo y el bulbo olfatorio. Igualmente, se ha sugerido la presencia de células dopaminérgicas en las inmediaciones del núcleo del rafe dorsal, que proyectarían, fundamentalmente, al núcleo accumbens (Stratford y Wirshafter, 1990) y a la médula oblongada (Lambás-Señas y col., 1985).

3.1. NÚCLEOS MESENFÁLICOS Y PROYECCIONES

Comprende los grupos celulares A8, A9 y A10, localizados en el núcleo retrorubral (en muchas ocasiones calificado como parte caudal de la sustancia negra), en la sustancia negra parte compacta (SNc) y en el área tegmental ventral (ATV), respectivamente. Hay que tener en cuenta que algunos estudios histológicos y electrofisiológicos indican que parte de las células del ATV y de la parte medial de la SN están colateralizadas y que una misma célula puede inervar zonas estriatales, límbicas y/o corticales (Deniau, Thierry y Feger, 1980; Fallon y Loughlin, 1982; Fallon, 1988).

La relación general de los sistemas monoaminérgicos con su función cerebral, puede deducirse de sus relaciones anatómicas con otros centros. Las aferencias noradrenérgicas y serotoninérgicas, tienden a relacionarse con un tipo de regulación general y muy extendida de la actividad neural, como se infiere de las diversas colateralizaciones de sus árboles axónicos. Así, una misma neurona serotoninérgica del núcleo del rafe (Van der Kooy, 1979; Van der Kooy y Kuypers, 1979; Van der Kooy y Hattori, 1980), o una noradrenérgica del locus coeruleus (Olson y Fuxe, 1971; Pickel y col., 1973, 1974), inervan múltiples áreas dianas postsinápticas. Los sistemas dopaminérgicos presentan un patrón diferente. En contraste con el resto de las monoaminas (Moore y Bloom, 1978), los grupos de neuronas dopaminérgicas mandan proyecciones discretas a regiones cerebrales precisas (Swanson, 1982). La mayoría de las neuronas del cerebro que contienen dopamina, están localizadas en la sustancia negra y proyectan al estriado, que contiene entre el 70-80% de la dopamina cerebral (Carlsson, 1959). Desde su descubrimiento hasta la actualidad son múltiples las funciones que se han asociado a los sistemas dopaminérgicos centrales: La organización extrapiramidal de los movimientos, en la que están implicados distintos grupos neuronales dopaminérgicos (Ungerstedt, 1971 a,b) y el mantenimiento del tono muscular (Ehringer y Hornykiewicz, 1960; Double y Cracker, 1995), han sido relacionados especialmente con el funcionamiento de los sistemas nigroestriatal y mesolímbico. De igual forma, el sistema dopaminérgico nigroestriatal está implicado en los efectos motores extrapiramidales que

acompañan a la administración de drogas antipsicóticas (Kuczenski, 1983) . Asimismo, el desarrollo de los patrones cinéticos de la cópula

(Rodríguez y col., 1984) y los patrones conductuales desarrollados por machos y hembras están mediados por sistemas serotoninérgicos y dopaminérgicos (Ahlenius y col., 1972; 1991; Melis y Argiolas, 1995). Los sistemas incertohipotalámico y mesoestriatal intervienen en la termorregulación (Kervin y col., 1980; González y col., 1985). Son numerosas las evidencias que relacionan a este neurotransmisor con los sistemas centrales de recompensa y placer (D`Mello, 1981) incluidos aquellos que parecen mediar el consumo de drogas (Robinson y Berridge, 1993), o con la integración del dolor (Curzon y col., 1981), la ingesta de alimentos (Smith, G.P. y Schneider, L.H., 1988). La proyección dopaminérgica mesolímbica/mesocortical, se asocia con la mayoría de los componentes cognitivos de la conducta (Fibiger y Phillios, 1986).

3.1.1. SISTEMA MESOESTRIATAL

Este es el mayor sistema dopaminérgico del cerebro. Incluye proyecciones de células A8, A9 y A10, que inervan los núcleos caudado-putamen y accumbens (Lindvall y Björklund, 1983; Palkovits y Brownstein, 1989). Estas fibras ascienden por el fascículo prosencefálico medial (MFB) y llegan al globo pálido, dónde pueden emitir colaterales que inervan este núcleo, y, finalmente, pasan a través de la cápsula interna para llegar a otras áreas diana (Fallon y Moore, 1978a).

La proyección más abundante sobre el estriado procede del grupo A9 (sistema nigroestriatal) (Fuxe, 1965; Ungerstedt, 1971a; Fallon y Moore, 1978a). La inervación nigroestriatal es,

en un 3%, contralateral y hay indicios de que cruza la línea media por la decusación tegmental ventral (Royce, 1978; Fass y Butcher, 1981; Altar y col., 1983; Doglas y col 1987).

La mayor parte de las células que proyectan al núcleo accumbens, pertenecen al grupo A10 y a la parte medial de la SN, existiendo proyecciones en menor cuantía desde el grupo A8 (Fallon y Moore, 1978a; Swanson, 1982; Domesick, 1988) y la ya mencionada de los grupos de las inmediaciones del rafe dorsal.

3.1.2. SISTEMA MESOLIMBOCORTICAL

Este sistema se origina en los grupos A8, A9 y A10, aunque fundamentalmente en el A10 y la parte medial del A9, limitándose el A8 a las áreas límbicas (Deutch y col., 1988). Este sistema conecta con varios núcleos del sistema límbico y la corteza cerebral. Las mayores inervaciones se encuentran en el bulbo y el tubérculo olfatorios, septum lateral, estria terminal, núcleos de la amígdala y corteza frontal. Proyecciones de menor intensidad se producen sobre áreas del lóbulo temporal (Fallon y Moore, 1978a; Fallon y col., 1978; Moore, 1978; Swanson, 1982; Domesick, 1988; Deutch y col., 1988) e hipocampo (Bischoff, Scatton y Korf, 1979; Scatton y col., 1980; Ishikawa, Ott y McGaugh, 1982; Yanagihashi y col., 1991).

3.1.3. SISTEMA MESODIENCEFÁLICO

Se han sugerido varias vías dopaminérgicas originadas en el mesencéfalo, que inervarían la habénula lateral, el núcleo

subtalámico y el hipotálamo. Sin embargo, parece que la inervación mesohabenular originada en el ATV es fundamentalmente de neuronas no dopaminérgicas. No es muy conocida la inervación sobre el núcleo subtalámico, y los datos relativos al hipotálamo son aún contradictorios (Lindvall y

Bjöklund, 1983). Por otra parte, recientemente, se han aportado evidencias obtenidas mediante técnicas de transporte retrógrado e inmunohistofluorescencia de eferencias dopaminérgicas al núcleo paraventricular del tálamo originada en A8 y A10 (Takada y col., 1990).

3.1.4. PROYECCIONES DENTRO DEL MESENCÉFALO

Estudios con trazadores y marcaje inmunohistofluorescente, han demostrado la existencia de una vía nigrotectal dopaminérgica que surge de la parte ventrolateral de la SN (Takada, Li y Hattori, 1988; Campbell y Takada, 1989). Estas neuronas suelen estar colateralizadas de forma que, muchas de ellas, envían colaterales al estriado ipsilateral y al colículo superior ipsi y contralateral (Campbell y Takada, 1989).

3.1.5. PROYECCIONES DESCENDENTES

Se han propuesto diversas vías dopaminérgicas mesencefálicas descendentes que proyectarían al núcleo del rafe, locus coeruleus, área peribraquial, cerebelo y médula espinal. Sin embargo, sólo hay resultados consistentes de la

inervación bilateral del locus coeruleus por neuronas de los grupos celulares A9 y A10 (Swanson, 1982).

3.2. NÚCLEOS DOPAMINÉRGICOS DEL PROSENCÉFALO

Las neuronas dopaminérgicas del diencefalo fueron divididas por Dahlström y Fuxe en cuatro grupos : A11 (distribuido en el área hipotalámica dorsal posterior y la sustancia gris periventricular del tálamo caudal), A12 (localizado en el núcleo arcuato), A13 (zona incerta) y A14 (localizadas en la región talámica periventricular ocupando el segmento entre la comisura anterior y el límite anterior de la eminencia media).

El sistema dopaminérgico diencefálico más conocido es el tuberoinfundibular que, originado en el grupo A12, inerva la eminencia media y los lóbulos posterior e intermedio de la hipófisis (Fuxe y Hökfelt, 1966; Björklund y col., 1973; Smith y Fink, 1975). Otros sistemas diencefálicos son el incertohipotalámico (A11, A13) y el periventricular (A11, A14). La única proyección extradiencefálica es la diencefalo-espinal, que tiene su origen en A11 e inerva las astas posteriores ipsilaterales de la médula espinal, si bien, existe, en menor cuantía, una innervación contralateral (Skagerberg y col., 1982, Skagerberg y Lindvall, 1985).

El único grupo de células dopaminérgicas en el telencefalo es el A15, conocido como sistema periglomerular. Los somas de estas neuronas están localizados en el bulbo olfatorio y sólo se han observado proyecciones locales (Halás y col., 1977).

4. NEURONAS DOPAMINÉRGICAS NIGROSTRIATALES

Las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales se encuentran fundamentalmente en la sustancia negra pars compacta, si bien también se localizan, en menor medida, en la pars reticulata y en la pars lateralis.

4.1. ANATOMIA Y CITOARQUITECTURA DE LA SUSTANCIA NEGRA

La sustancia negra está situada en la parte ventral del tegmento mesencefálico. Está dividida en tres partes: 1) Pars compacta (SNc), constituida por una estrecha banda de alta densidad de cuerpos neuronales localizada en la parte más dorsal, 2) la pars reticulata (SNr), que ocupa la zona dorsal haciendo contacto por su parte ventral con el pedúnculo cerebral, y, C) la pars lateralis (SNI), que constituye la parte más pequeña del núcleo que se sitúa en la parte dorsolateral. Los somas de las neuronas dopaminérgicas A9 se sitúan mayoritariamente en la pars compacta, existiendo en menor cuantía en la SNI, y, de forma esporádica, también se pueden encontrar en la SNr.

4.1.1. PARS COMPACTA

Cada sustancia negra de las ratas contiene entre 13.000-15.000 neuronas dopaminérgicas (Guyenet y Crane, 1981). Estas neuronas son de tamaño intermedio con forma piramidal, poligonal u ovoide cuyos somas miden en su eje mayor 18-30um y en su eje menor 12-13um (Grace y Bunney, 1983b; Kita, Kita y Kitai, 1986; Tepper, Sawyer y Groves, 1987). Tienen de 3 a 6 procesos dendríticos principales de 4-8 um de diámetro que se prolongan 10-50 um antes de bifurcarse, pudiendo dividirse 2 ó 3 veces más. Una o dos de las dendritas

principales se introducen y ramifican en la SNr de manera perpendicular al eje de la SNc (Wassef, Berod y Sotelo, 1981; Juraska,

Wilson y Groves, 1977; Fuxé et al., 1978; Grace y Bunney, 1983b; Kita, Kita y Kitai, 1986; Tepper, Sawyer y Groves, 1987). Las dendritas que no penetran en la pars reticulata se extienden dentro de la pars compacta siendo muy raro que salgan del núcleo, con la excepción de las localizadas más medialmente que pueden penetrar en el área tegmental ventral adyacente (Juraska, Wilson y Groves, 1977). La gran densidad de cuerpos neuronales de la pars compacta unido a los procesos dendríticos de estas células hace que exista un gran solapamiento entre las arbolizaciones dendríticas de diferentes neuronas de esta zona del núcleo (Juraska, Wilson y Groves, 1977).

Los axones surgen por lo general de una de las dendritas principales, en la rata no están mielinizados, suelen tener un diámetro inferior a 1µm y no emiten colaterales dentro de la SN (Juraska, Wilson y Groves, 1977; Wassef, Berd y Sotelo, 1981; Grace y Bunney, 1983b; Kita, Kita y Kitai, 1986; Tepper, Sawyer y Groves, 1987).

Además de las neuronas dopaminérgicas, la pars compacta contiene una pequeña proporción (18%) de neuronas no dopaminérgicas de pequeño tamaño, forma estrellada y cuyas prolongaciones dendríticas no suelen pasar los límites de la SNc (Juraska, Wilson y Groves, 1977).

4.1.2. PARS RETICULATA

La pars reticulata tiene una concentración menor de somas neuronales y está constituida fundamentalmente por una población heterogénea de neuronas gabaérgicas (Oertel y Mugnaini, 1984) en cuanto a su morfología y proyecciones. Esta parte del núcleo está compuesta por interneuronas de forma estrellada y pequeño tamaño (29% según Juraska, Wilson y Groves, 1977) y por neuronas de proyección de tamaño intermedio (Faull y Mehler, 1978).

Por lo general, las dendritas de estas neuronas no sobrepasan los límites

de la SNr, los axones están mielinizados y la mayoría de ellos emiten entre 1 y 5 colaterales, algunos de los cuales terminan sobre las distintas divisiones de la SN (Juraska, Wilson y Groves, 1977; Grofova, Deniau y Kitai, 1982; Deniau et al., 1982). Estas células de proyección son, en su mayoría nigrotalámicas, nigrocoliculares o nigropontinas (Rinvik, Grofova y Ottersen, 1976; Graybiel, 1978; Grofova, Deniau y Kitai, 1982). La eferencia hacia el tálamo termina en el núcleo ventromedial (Herkenham, 1979; Gerfen et al., 1982), aunque existen inervaciones nigrales menores sobre otras áreas talámicas (Gerfen et al., 1982; Paré et al., 1990). La vía nigrotectal proyecta al colículo superior (Rinvik, Grofova y Ottersen, 1976; Grofova, Ottersen y Rinvik, 1978), ejerciendo un control inhibitorio sobre estas células (Chevalier et al., 1981). Esta proyección es fundamentalmente gabaérgica puesto que el 98% de sus neuronas son inmunoreactivas al GABA (Ficalora y Mize, 1989) y la lesión de la SN causa una importante disminución de los niveles de GABA en el colículo superior (Kilpatrick, Collingridge y Starr, 1982). Por otra parte, la SNr es la principal fuente de aferencias del núcleo pedúnculo pontino (Rinvik, Grofova y Ottersen, 1976; Jackson y Crossman, 1981; Gerfen et al., 1982; Beckstead, 1983; Moon Edley y Gabriel, 1983; Moriizumi et al. 1988) y se ha observado que células de la pars reticulata establecen contactos sinápticos con neuronas de este núcleo (Nakamura et al., 1989). La estimulación eléctrica de la sustancia negra produce PIPS en células de éste núcleo (Noda y Oka, 1984), y estos efectos son eliminados con la administración de bicuculina (bloqueante de los receptores gabaérgicos), por lo que es muy probable que sea una proyección gabaérgica (Kang y Kitai, 1990). Las células de proyección de la SNr están altamente colateralizadas, lo que posibilita que una misma célula pueda proyectar a 2 ó 3 áreas diana diferentes tanto ipsi como contralaterales (Anderson y Yoshida, 1977; Deniau et al., 1977, 1978; Steindler y Deniau, 1980; Beckstead, 1983).

4.1.3. PARS LATERALIS

Comparte características de las otras dos divisiones de la sustancia negra. Tiene neuronas pequeñas, medianas y grandes. Las pequeñas suelen ser

similares a las descritas en la SNr, y entre las intermedias y grandes se encuentran dopaminérgicas (Juraska, Wilson y Groves, 1977) y nigrotectafes gabaérgicas (Ficalora y Mize, 1989).

4.2. IDENTIFICACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA

La identificación electrofisiológica de las neuronas A9, se ha llevado a cabo siguiendo diferentes procedimientos experimentales:

Asociando un tipo característico de espiga -de neuronas registradas en zonas ricas en células dopaminérgicas- con el aumento de dopamina en esa neurona tras la administración microiontóforética de diferentes sustancias que incrementan la síntesis de DA.

La primera identificación electrofisiológica de las células A9 se debe a Bunney y col. (1973). Ellos estudiaron las características de las espigas extracelulares de células localizadas en los grupos celulares A9 y A10 y luego comprobaron, por histofluorescencia, la zona del registro. Estos estudios se completaron con la aplicación por microiontóforésis de una cantidad pequeña del precursor de DA, L-DOPA, en la vecindad de la neurona registrada. Como en esta región sólo las neuronas DA son capaces de recaptar L-DOPA desde el espacio extracelular y convertirlo en DA, únicamente las neuronas dopaminérgicas de la vecindad de la puntas de las micropipetas de microiontóforésis y de registro, incrementan los niveles de DA. Así, las células de la zona de eyección de la L-DOPA podían ser identificadas como dopaminérgicas, por su incremento en la intensidad de fluorescencia, consecuencia del aumento de DA. Las neuronas identificadas como dopaminérgicas se caracterizaban por:

1. potenciales de acción bifásicos con una primera fase positiva.

2. frecuencia de descarga entre 2-9 espigas por segundo.

3. ocasionales ráfagas caracterizadas por disminución de la amplitud e incremento en la duración de las espigas conforme avanza la ráfaga.

Este tipo de neuronas no se pudieron registrar en la SN tras la administración del neurotóxico 6-OHDA (específico de células catecolaminérgicas).

Grace y Bunney (1980, 1983a) constataron esta distinción electrofisiológica entre células dopaminérgicas y no dopaminérgicas de la SN utilizando un método más directo y preciso. Localizaban neuronas mediante el registro extracelular, según las características definidas por Bunney y col. (1973), y a continuación realizaban el registro intracelular, tras lo cual administraban intracelularmente por iontoforesis L-DOPA, tetrabiopterina o colchicina, y estudiaban por histofluorescencia el incremento o no de las concentraciones de dopamina. Encontraron que, sólo los registros con las características atribuidas a las neuronas dopaminérgicas, incrementaban la fluorescencia, consecuencia de un aumento en las concentraciones de DA en las células registradas.

Otro método utilizado para identificar y clasificar las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales consiste en estudiar su respuesta antidrómica. La mayoría de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra proyectan al estriado. La estimulación eléctrica del estriado despolariza las terminales y axones dopaminérgicos que allí se encuentran y genera un potencial antidrómico. Esta respuesta es posible diferenciarla de aquellas mediadas por una o más sinapsis, es decir, consecuencia de la activación de células estriatales o vías de paso que, en último término, hacen contacto sináptico con las neuronas dopaminérgicas y que provocan en ellas un potencial de acción. Existen una serie de criterios que permiten diferenciar estos dos tipos de respuesta (antidrómica vs. ortodrómica-transináptica) (Fuller y Schlang, 1978; Lipski, 1981; Chiodo, 1988):

I

1.- Latencia fija y aparición en cada estimulación: Las respuestas antidrómicas al depender de la excitación del axón y de su velocidad de conducción, presentan pocos factores que actúen sobre su producción y latencia. En las respuestas transinápticas a éstos se unen otros factores propios de la transmisión sináptica, por lo que tienen mayor dificultad para aparecer en cada estimulación y con una latencia fija (Grace, 1987).

2.- Permanencia de la respuesta a alta frecuencia de estimulación: Las respuestas transinápticas tienen dificultad para seguir altas frecuencias de estimulación, puesto que los mecanismos de la sinapsis actúan como un filtro para eventos muy rápidos (Grace, 1987).

3.- Colisión con un potencial de acción espontáneo: Si estimulamos las terminales o el axón dopaminérgico, con una demora lo suficientemente pequeña, después de un potencial de acción espontáneo ortodrómico, sucederá que la respuesta antidrómica y el potencial de acción espontáneo se encontrarán en algún punto del axón. Este suceso, denominado colisión, hace que ninguno de los potenciales pueda seguir viajando porque el axón a ambos lados de ese punto se encuentra en período refractario. De este modo, la colisión hace que la respuesta antidrómica no llegue al soma de la célula en registro. Sin embargo, con respuestas transinápticas no sucederá este fenómeno, al viajar los dos potenciales de acción por axones diferentes.

Una de las características de la respuesta antidrómica de las neuronas dopaminérgicas, es que pocas veces se observa un PA completo, especialmente cuando se estimula a alta frecuencia. Lo más usual es observar un potencial de menor amplitud como respuesta antidrómica. Los registros extracelulares han observado que este pequeño potencial se corresponde con la inflexión de la primera fase del potencial de acción, y se asume que se trata del componente del segmento inicial (SI); mientras que el resto de la onda del potencial de acción, es el componente somatodendrítico (SD) del mismo. No obstante, tanto cuando la respuesta es este pequeño potencial, como cuando se observa un potencial de acción

completo, los criterios de las respuestas antidrómicas se cumplen (Deniau y col., 1978; Guyenet y Aghajanian, 1978; Grace y Bunney, 1980, 1983a, b).

Los registros intracelulares muestran que, cuando se observa sólo el componente SI como respuesta antidrómica, éste surge sobre un potencial postsináptico inhibitorio (PIPS) (Grace y Bunney, 1980; Grace y Bunney, 1985). El PIPS resulta, posiblemente, de la activación ortodrómica de una vía inhibitoria estriatonigral. Esto podría implicar un fallo del componente SI del potencial de acción para invadir el soma, debido a la hiperpolarización del mismo por el PIPS, con lo cual sólo se registraría el componente del SI y no el SD. Así, cuando la activación antidrómica resulta en un potencial de acción completo, la aplicación en el soma de una corriente hiperpolarizante puede impedir la invasión somática, resultando como respuesta antidrómica simplemente el componente SI del potencial de acción (Grace y Bunney, 1983b). Por otra parte, este tipo de respuesta antidrómica suele estar presente en células que tienen un bajo factor de seguridad de invasión somática (Lipski, 1981). Este bajo factor de seguridad podría implicar un valor umbral diferencial del SI con respecto al soma, posiblemente, como consecuencia del menor diámetro del primero que generaría una mayor densidad de corriente en el SI en relación al soma y, por otra parte, debido a la lejanía de éste en la mayoría de las neuronas dopaminérgicas, al no surgir directamente del soma, sino de una de las dendritas principales (Grace y Bunney, 1983a; Grace, 1990).

En definitiva, sólo con el registro extracelular se puede decir que una neurona es dopaminérgica nigrostriatal si cumple:

1. Potencial bifásico o trifásico con primera fase positiva y con frecuente inflexión en esa primera fase.
2. Entre 2 y 5 ms de duración de la espiga del potencial de acción.
3. Frecuencia de descarga entre 0 y 10 espigas/s, pudiendo demostrar actividad en ráfagas, caracterizadas por disminución de amplitud de las espigas y aumento de la duración del potencial de acción.

4. Respuesta antidrómica por estimulación estriatal con velocidad de conducción entre 0,3-0,7 m/s.

Las neuronas nigrales no dopaminérgicas, en cambio, presentan potenciales de acción con menor duración (en torno a 1 ms) y/o bien no presentan esta forma de onda; su rango de frecuencia oscila entre 0-60 espigas/s y no tienen respuesta antidrómica por estimulación estriatal o, en caso de existir, la velocidad de conducción se sitúa entre 1-10 m/s (Bunney y col., 1973; Guyenet y Aghajanian, 1978; Deniau y col., 1978; Grace y Bunney, 1980,1983a,b; Wang, 1981; Grace, 1987, 1988; Chiodo, 1988).

4.3. PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS BÁSICAS

4.3.1. CARACTERÍSTICAS BIOELÉCTRICAS

Las neuronas dopaminérgicas registradas *in vivo*, típicamente presentan una resistencia de entrada (Rin) moderada, cuyo valor oscila entre los 18 y 85 MS², y constante de tiempo de membrana de 12 t 3 ms. (Grace y Bunney 1983a).

Es interesante notar que los registros realizados en *preparaciones in vitro* de rodajas cerebrales (Llinás y col., 1984; Kita, y col., 1986; Grace, 1987) o en cultivos (Chiodo y Kapatos, 1992) han mostrado que la Rin es, en estos casos, varias veces superior a la obtenida en preparaciones *in vivo*. Los valores oscilan entre 70-300 MS². Esta diferencia en la Rin, puede ser debida a la carencia de aferencias sinápticas tónicas en las preparaciones *in vitro* (Kita y col., 1986; Grace, 87; Chiodo y Kapatos, 1992).

El potencial de membrana en reposo de las células dopaminérgicas es muy variable y parece estar relacionado con la actividad espontánea. En células espontáneamente activas éste se sitúa en torno a -55 mV; en las células silentes oscila entre -65 y -75 mV (Grace y Bunney, 1984a).

El valor umbral también varía (entre -35 y -45 mV), aunque lo normal es que se encuentre en torno a -41 mV (Grace y Bunney, 1984a; Grace, 1990).

El potencial de acción de las neuronas dopaminérgicas es de larga duración, oscilando entre 2 y 5 ms (Grace y Bunney, 1983a). La amplitud del mismo depende de la actividad de la célula, de forma que, en células de baja frecuencia (< 1 espiga/segundo), alcanza los 75 mV; mientras que en células con mayores frecuencias, la amplitud suele situarse entre 55-65 mV (Grace y Bunney, 1983a).

4.3.2. ACTIVIDAD ESPONTÁNEA

En las preparaciones experimentales más frecuentemente usadas (ratas anestesiadas con hidrato de cloral o paralizadas con galamina), las neuronas dopaminérgicas pueden estar activas o silentes. Las células silentes, que presentan respuesta antidrómica, pueden ser activadas por la administración intravenosa de haloperidol (Bunney y Grace, 1978), por la administración microiéntofórica de colecistoquinina (CCK) o glutamato (Skirboll y col., 1981; Grace y Bunney, 1984a). Se estima que el 40-50% de las células dopaminérgicas están silentes (Chiodo, 1988). La frecuencia de descarga de las neuronas dopaminérgicas espontáneamente activas

oscila entre 0,2 y 10 espigas/segundo, sibien lo más frecuente es encontrar células que descargan entre 4-5 espigas/segundo y muy pocas células pasan los límites del intervalo 1 y 9 espigas/s (Grace y Bunney, 1984a). La media de los intervalos interespiga (tiempo transcurrido entre una espiga y la siguiente), normalmente oscila entre 200-250 ms (Grace y Bunney, 1984a). Después de la generación de una espiga, existe un período de inhibición en el que la probabilidad de encontrar otro potencial de acción está dramáticamente reducida. Este período inicial dura entre 40 y 80 ms, para incrementarse otra vez en el intervalo 150-200 ms, postpotencial (Wilson, Young y Groves, 1977).

4.3.3. PATRÓN DE DESCARGA

En preparaciones in vivo (ratas anestesiadas, paralizadas y en libre movimiento), las neuronas dopaminérgicas pueden presentar dos modos fundamentales de descarga espontánea. Estos dos patrones son: uno en forma de espigas individuales, que se caracteriza por la descarga de potenciales de manera continua y con intervalos irregulares; otro modelo es la descarga en ráfagas, en el que se entremezclan espigas simples con momentos en los que se disparan ráfagas que consiste en una serie de tres a ocho espigas con intervalos más cortos, seguidas por un período inhibitorio (Grace y Bunney 1984 a, b). En ratas anestesiadas, las células dopaminérgicas disparan, bien en modo de espigas simples, o bien de forma que se entremezclan espigas simples con momentos en los que se disparan ráfagas; mientras que, en células dopaminérgicas registradas en ratas no anestesiadas, es más frecuente encontrar una alternancia rápida entre los dos modelos de descarga (Freeman y co1.,1985; Freeman y Bunney 1986).

Las neuronas dopaminérgicas localizadas en la mitad posterior de la SNc, presentan mayor actividad en ráfagas que las restantes, mientrasque en

las células de la mitad anterior de la SNc, predomina la descarga irregular en espigas simples (Shepard y German, 1988a,b). No obstante, la descarga en ráfagas puede provocarse en las neuronas dopaminérgicas mediante la administración sistémica de haloperidol, o con la administración iontoforética de neurotransmisores excitatorios. Así, las neuronas dopaminérgicas son, aparentemente, capaces de modificar su patrón de descarga en respuesta a la demanda (Grace, 1987).

4.3.3.1. PATRÓN DE DESCARGA EN FORMA DE ESPIGA SIMPLE

Esta forma de descarga parece estar originada por la propia célula, como consecuencia de una alternancia de dos corrientes iónicas transmembranales: una despolarización lenta (13 t 3 mV de amplitud; 78 ms de duración) dependiente de voltaje causante del disparo de la espiga. Seguidamente aparece una hiperpolarización post-potencial (HPP). La despolarización lenta precede a los PAs espontáneos, llevando el potencial de membrana desde su valor de reposo hasta el valor umbral. Existen evidencias que indican que esta despolarización lenta es debida a un flujo hacia el interior de iones sodio (sensible a tetrodoxina) (Grace, 1987, Chiodo y Kapatos, 1992) y/o calcio (Grace, 1987).

La HPP comparte muchas características con la corriente de K^+ activada por Ca^{2+} (Grace y Bunney, 1984a; Chiodo y Kapatos, 1992). La inyección intracelular del secuestrador de calcio EGTA, bloquea la HPP. Este bloqueo, además, revela dos funciones más de esta corriente de K^+ activada por Ca^{2+} . La acomodación de la descarga ante a un estímulo de corriente despolarizante, suficiente para provocar sólo dos o tres espigas, puede provocar, tras la inyección de EGTA, siete espigas o más. Esto

viene acompañado por un cambio en el patrón de descarga, desde un modo irregular con espigas simples, a un verdadero marcapasos (Grace, 1987).

4.3.3.2. PATRÓN DE DESCARGA EN RÁFAGAS

Las ráfagas son un aumento transitorio de la frecuencia de descarga. Se caracterizan por una disminución de la amplitud y un aumento de la duración del potencial de acción, conforme avanza la ráfaga. Pueden estar compuestas por más de 20 potenciales de acción si bien, generalmente, son ráfagas compuestas de 2-4 espigas (Grace y Bunney, 1983a; Freeman, Meltzer y Bunney, 1985), siendo la media de 2,9 (Grace y Bunney, 1984b). El cómputo de la actividad en ráfagas se realiza por ordenador, utilizando los criterios propuestos por Grace y Bunney (1984b). Estos criterios establecen que el ordenador registrará que se inicia una ráfaga cuando se detecte un intervalo interespiga menor de 80 ms, y la dará por terminada cuando aparezca un intervalo mayor de 160 ms. La media de los intervalos interespigas en ráfagas medidas de esta forma es de 73 ms, siendo el primer intervalo ligeramente menor que los restantes (62 ms). El período inhibitorio postráfaga medio, es de 342 ms, tendiendo a incrementarse en función de la longitud de las ráfagas (Grace y Bunney, 1984b).

El 55% de las neuronas dopaminérgicas presentan, en algún momento, actividad en ráfaga y el 29% del total de las espigas se producen dentro de ráfagas. La correlación entre la frecuencia total de descarga y la descarga en ráfagas es de 0,38 para el conjunto de las células A9 (Grace y Bunney, 1984b) pero es algo superior (0,60) para aquellas identificadas como nigroestriatales (Chiodo, 1988). De este modo, pueden haber células muy lentas con un alto porcentaje de actividad en ráfagas y células más rápidas con porcentajes muchos menores. Esto podría indicar que la ráfaga no

es, simplemente, un mecanismo para incrementar la frecuencia de descarga.

La funcionalidad de este modelo de descarga es aún desconocida. Grace y Bunney (1984b) postulan que las ráfagas podrían ser un mecanismo para aumentar la eficacia en la liberación de la dopamina en el estriado. Este efecto de la descarga en ráfaga no sólo tendría como consecuencia la acumulación de dopamina de distintos potenciales de acción sino que, además, podría implicar la modificación de la cantidad de neurotransmisor liberado por potencial de acción. Se ha observado que la liberación de dopamina en el estriado inducida por la estimulación eléctrica del MFB es mayor cuando se aplica la misma cantidad de estimulaciones en ráfagas que cuando se hace a intervalos iguales. Este efecto, posiblemente, podría ser consecuencia de una relación exponencial entre liberación de dopamina y frecuencia de descarga. De este modo, el incremento de la frecuencia de descarga, en el período que dura una ráfaga (10-20 espigas/s), produciría un aumento de la eficacia de los PAs para liberar DA (Gonon y Buda, 1985).

Los registros realizados en animales en libre movimiento han mostrado que la actividad espontánea es muy similar a la que presentan estas células en las preparaciones clásicas con anestesia (hidrato de cloral) o con paralizantes (galamina). La media de frecuencia en libre deambulación oscila entre 3,4-5,5 espigas/segundo (Miller, Sanghera y German, 1981; Steinfels, Heym y Jacobs, 1981; Freeman, Meltzer y Bunney, 1985; Freeman y Bunney, 1987; Trulson, Preussler y Howell, 1981). No obstante, la similitud no es total. Freeman, Meltzer y Bunney (1985) obtuvieron una diferencia significativa en la frecuencia de descarga, a favor del grupo de libre movimiento (4,5 vs. 5,5 espigas/s). Igualmente, han sido detectadas diferencias en la actividad en ráfagas, observándose una mayor incidencia de éstas en registros de animales en libre deambulación, aunque sus características son similares a las observadas en animales anestesiados o paralizados.

Del mismo modo, el porcentaje de células que presentan actividad en ráfagas en ratas en libre movimiento es superior (90%) (Freeman y Bunney, 1987), así como el porcentaje de potenciales de acción en ráfagas en relación al total (50%) (Freeman, Meltzer y Bunney, 1985).

4.3.4. REGISTROS INTRACELULARES *IN VITRO*

Las neuronas dopaminérgicas registradas *in vitro* poseen características significativamente diferentes de las registradas *in vivo*. La resistencia de entrada de las neuronas dopaminérgicas registradas *in vitro* oscilan entre 145 y 300 MS², que es de cuatro a cinco veces mayor que la resistencia de entrada registrada *in vivo* (Grace y Bunney 1983b; Llinás y col., 1984; Pinnock 1984; Kita y col., 1986; Silva y Bunney, 1986; Shepard y Bunney, 1991).

Otra diferencia la encontramos en el patrón de descarga. Las neuronas dopaminérgicas registradas en rodajas cerebrales, disparan con un patrón muy regular en marcapasos (Grace y Bunney 1983b; Sanghera y col., 1984; Silva y Bunney 1986). Este patrón de descarga en marcapasos es similar al observado en estudios *in vivo* tras la administración intracelular de EGTA (Grace, 1987).

Los potenciales de acción registrados *in vitro*, al igual que ocurre *in vivo*, son disparados por una despolarización lenta (Kita y col., 1986; Pinnock, 1984). Esta despolarización lenta también presenta una activación-desactivación voltaje dependiente, consistente con lo observado *in vivo*, sugiriendo que es más de naturaleza endógena que mediada por sinapsis (Grace, 1987).

4.4. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS NIGROESTRIATALES

4.4.1. AUTORREGULACIÓN POR LIBERACIÓN DE DOPAMINA EN LA SN

Las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, además de liberar dopamina en el estriado, también liberan dopamina en la misma sustancia negra desde sus dendritas. Esta dopamina puede actuar sobre las propias neuronas dopaminérgicas, autoinhibiéndolas a través de su acción sobre autorreceptores.

Las células A9 presentan gran cantidad de varicosidades en las dendritas (Björklund y Lidvall, 1975; Juraska y col., 1977; Fuxé y col., 1978; Wassef y col., 1981; Tepper y col., 1987). Estas varicosidades, más que un simple aumento del diámetro de las dendritas, son lugares de acumulación de dopamina (Björklund y Lindvall, 1975; Fuxé y col., 1978) que puede ser liberada al medio extracelular (Chéramy y col., 1981; Geffen y col., 1976; Korf y col., 1976; Nieoullon y col., 1977a).

La existencia de receptores de dopamina sobre neuronas A9 - autorreceptores- fue propuesta por Aghajanian y Bunney (1973) con el fin de explicar el efecto inhibitorio sobre la frecuencia de descarga de la aplicación microiontoforética de DA y agonistas dopaminérgicos a las células dopaminérgicas (Aghajanian y Bunney, 1973, 1974, 1977). Este efecto puede ser eliminado con la administración intravenosa o local de bloqueantes de receptores dopaminérgicos (Aghajanian y Bunney, 1973; Groves y col., 1975), lo que sugiere que es un efecto mediado directamente por estos receptores. Igualmente, la aplicación intranigral de distintos agonistas y antagonistas dopaminérgicos, modifica la liberación dendrítica de DA y de las terminales estriatales. Así, la administración nigral de DA reduce la liberación espontánea de ésta en el caudado ipsilateral (Chéramy y col., 1977). Resultados similares se obtienen con la amfetamina o benzotropina (Nieoullon y col., 1979). La aplicación de

α -metil paratirosina, que inhibe la actividad de la TH (Leviel y col., 1979), o de bloqueantes de los receptores (Nieoullon y col., 1979) incrementa la liberación de DA en las terminales estriatales. Todos estos resultados llevan a pensar que la liberación dendrítica de DA inhibe la actividad de las células dopaminérgicas nigroestriatales.

De gran importancia es el papel que juegan estos autorreceptores en el efecto ejercido por los fármacos que afectan a la neurotransmisión dopaminérgica (Groves y col., 1975). En este sentido, Skirboll, Grace y Bunney (1979) observaron que, las células A9, son de seis a diez veces más sensibles a la administración de apomorfina o a la aplicación microiontoforética de DA, que las células del núcleo caudado.

Además de la liberación dendrítica de DA, también cabe la posibilidad de una liberación dendrítica de CCK. Este péptido que coexiste con la DA en una población de células del ATV, y en la zona medial de 1a SNc (Hókfelt y col., 1980), también tiene efectos sobre la actividad de las propias células dopaminérgicas. Aunque no existe confirmación de la liberación dendrítica de CCK, el que su acción se restrinja a las zonas nigrales dónde coexiste, podría indicarlo así (Skirboll y col., 1981; Hommer y Skirboll., 1983; Hommer y col., 1986; Skirboll y Hommer, 1985). La CCK, por una parte, incrementa la frecuencia de descarga y la actividad en ráfagas de las células dopaminérgicas (Skirboll y col., 1981; Skirboll y Hommer, 1985; Bunney, 1987), y, por otra, potencia la inhibición inducida por apomorfina o por la DA (Skirboll y col., 1981; Hommer y Skirboll., 1983; Hommer y col., 1986; Skirboll y Hommer, 1985; Chiodo y Bunney, 1987; Bunney, 1987; Chiodo y col., 1988). Estos efectos son bloqueados totalmente por proglumide, un antagonista de los receptores de CCK (Chiodo y Bunney, 1987; Chiodo y col., 1987). Resultados similares se han obtenido animales en libre movimiento (Freeman y Bunney, 1987).

4.4.2. REGULACIÓN POR NEURONAS DOPAMINÉRGICAS VECINAS

La baja densidad de sinapsis dendrodendríticas, encontradas entre células dopaminérgicas sugiere un papel limitado de acción sináptica de la dopamina entre células dopaminérgicas (Wassef, Berod y Sotelo, 1981; Groves y Linder, 1983). No obstante, es lógico pensar que la DA liberada por las dendritas de una neurona pueda alcanzar los autorreceptores de otras células dopaminérgicas vecinas, sobre todo teniendo en cuenta el solapamiento existente entre los campos dendríticos de las neuronas dopaminérgicas.

Por otra parte, las interacciones entre neuronas dopaminérgicas de la SN no se limitan a los efectos mediados por neurotransmisores. Grace y Bunney (1983c) han aportado datos que sugieren la existencia de sinapsis eléctricas entre neuronas dopaminérgicas. La inyección intracelular de amarillo Lucifer en una célula nigroestriatal dopaminérgica, hace que se marquen entre dos y cinco neuronas vecinas, lo que indica que deben existir vías de comunicación entre los citoplasmas de neuronas vecinas. Por otra parte, en los registros intracelulares de células A9, es frecuente observar potenciales rápidos de 3-15 mV, que pueden ser agrupados de tres a cinco clases, en función de la amplitud (Grace y Bunney, 1980; 1983c). Grace y Bunney sugieren que estos potenciales rápidos son consecuencia de la propagación de potenciales de acción de células vecinas a la célula en registro por medio de vías citoplasmáticas. Estos potenciales pueden ser provocados por la estimulación eléctrica del estriado ipsilateral y, siguen todos los criterios de las respuestas antidrómicas, con la excepción de que no pueden ser colisionados con un potencial de acción espontáneo. Además, la latencia de estos potenciales rápidos, desde la estimulación del estriado, es similar a la latencia de las respuestas antidrómicas de las células dopaminérgicas. Tomando en consideración todos estos datos, se puede asumir la presencia de sinapsis eléctricas entre células dopaminérgicas nigroestriatales.

Los potenciales rápidos, con mucha frecuencia, pueden llegar a generar un PA, especialmente cuando el potencial de membrana se encuentra cerca del valor umbral. Bunney y col., entienden que la función de estas sinapsis eléctricas sería incrementar el grado de sincronización entre las neuronas dopaminérgicas. En esta línea, estos autores han mostrado registros simultáneos de pares de neuronas dopaminérgicas en los que se observa una clara tendencia a la sincronización de las descargas de ambas con un ligero desfase (1-3 ms). Esta tendencia a la sincronización de las células A9 está presente, tanto en animales anestesiados (Grace y Bunney, 1983c), como en libre movimiento (Freeman y col., 1985; Freeman y Bunney, 1987).

En definitiva, es muy probable que las neuronas dopaminérgicas A9 se encuentren reguladas por la actividad eléctrica de neuronas vecinas, tanto por la liberación de DA desde las dendritas como por las sinapsis eléctricas.

4.4.3. REGULACIÓN POR CÉLULAS NO DOPAMINÉRGICAS DE LA SNr

Existe una acción inhibitoria de las células gabaérgicas de la SNr sobre las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta. Son varias las evidencias que así lo indican. Por una parte, tanto las células dopaminérgicas como las de la SNr son inhibidas por la administración microiontóforética de GABA (Grace y Bunney, 1979; Waszczak y col 1980; Grace y Bunney, 1985). Sin embargo, la administración intravenosa de muscimol, un agonista gabaérgico, inhibe la actividad de las neuronas de la SNr e incrementa la frecuencia de descarga de las células dopaminérgicas (Walters y Lakoski, 1978; Waszczak, Eng y Walters, 1980). Este efecto paradójico se explica por la sensibilidad diferencial de ambos tipos de células al GABA y por las relaciones funcionales entre ellas. Las células de la SNr son unas 20 veces más sensibles a la inhibición por GABA aplicada iontóforéticamente que las de la SNc (Grace

y Bunney, 1979; Collinbridge y Davies, 1981). Si las células de la SNr tuvieran un efecto inhibitorio sobre las dopaminérgicas, el muscimol i.v., al afectarlas más intensamente, eliminaría su inhibición sobre las dopaminérgicas, con lo cual se explicaría el efecto estimulador del muscimol sobre las células A9. Existe una relación inversa entre el efecto de dosis sucesivas y crecientes ~e muscimol i.v. sobre la frecuencia de descarga de las células A9 y las no dopaminérgicas de la SNr, de forma que la máxima inhibición de las células de la SNr se corresponde con la máxima estimulación de las dopaminérgicas (Grace y Bunney, 1979; Waszczak, Eng y Walters, 1980).

Por otra parte, la aplicación microiontoforética de glutamato incrementa la frecuencia de descarga de todas las células de la SN. Sin embargo, cuando la aplicación de esta sustancia se realiza en una zona ventral a una célula dopaminérgica, produce una marcada inhibición sobre ésta. Esto se explicaría por la acción estimuladora del glutamato sobre las células de la SNr, que inhibirían a la célula dopaminérgica en registro (Grace y Bunney, 1979).

Además, se ha observado que la actividad de las células de la pars reticulata y de la compacta están relacionadas. Algunas neuronas de la SNr dorsal incrementan su frecuencia con estímulos nocivos. Este aumento de la frecuencia está relacionado, en el tiempo, con una inhibición de las A9 registradas inmediatamente dorsales a las primeras (Grace y Bunney, 1979; Grace y col., 1980).

Otra línea de evidencia surge del efecto de la estimulación eléctrica del estriado. La estimulación del estriado produce PIPS tanto en las células A9 como en las células de la SNr con la misma latencia (1,82,2 ms). La estimulación de intensidad moderada inhibe la frecuencia de los dos tipos de células, pero la estimulación de intensidad baja (20-50 pA) incrementa la frecuencia de las A9 e inhibe la frecuencia de descarga de las neuronas de la SNr en un 76% de su frecuencia espontánea (Grace y Bunney, 1985). Hay que tener en cuenta que algunas de las neuronas estriatonigrales son gabaérgicas y hacen contacto con células de la SNc y de la SNr aunque, preferentemente, sobre esta última y los efectos de la

estimulación estriatal pueden ser reducidos o bloqueados por la aplicación microiontóforética de bicuculina (Collibridge y Davies, 1981); de modo que las células de la pars reticulata son más sensibles a la estimulación estriatal (Dray y col., 1976; Collibridge y Davies, 1981; Grace y Bunney, 1985). Si la estimulación se hace con suficiente amplitud como para inhibir las células de la SNr, pero no las A9, se observa que la estimulación estriatal produce un aumento de la frecuencia de descarga de las neuronas dopaminérgicas nigrales.

Por último, se sabe que algunos colaterales de las células de la SNr cursan y terminan sobre la SNr y SNc donde se encuentran las dendritas y somas dopaminérgicos (Juraska y col., 1977; Grofova y col., 1982; Deniau y col., 1982). Hajós y Greenfield (1994) determinaron la procedencia de las neuronas de la SNr que, tras su estimulación eléctrica, eran capaces de provocar PIPs en las células dopaminérgicas de la pars compacta. Encontraron que las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra están ordenadas en módulos funcionales de manera que la mayoría de la inhibición desde la SNr procede de un circuito muy organizado con las células adyacentes de la pars reticulata. Las células de la SNr que inhiben a las dopaminérgicas de la compacta forman un cono que subrodea a la dendrita apical de la célula A9 en registro.

4.4.4. REGULACIÓN POR CÉLULAS NO NIGRALES: AFERENCIAS A LA SUSTANCIA NEGRA

4.4.4.1. VÍA CÓRTICO-NIGRAL

Se ha descrito una vía corticonigral originada en la corteza prefrontal insular, lateral y medial que inerva la SNc (Beckstead, 1979; Gerfen y col.,

1982). Por otra parte, se ha demostrado la naturaleza glutamérgica de una proyección corticofugal que, partiendo de áreas rostromediales de la corteza prefrontal, alcanza la sustancia negra (Carter, 1982; Kornhuber y cols., 1984; Chistie y col., 1986). Estudios electrofisiológicos ponen de manifiesto que, tras la estimulación de la corteza prefrontal, se obtiene un aumento de descarga en ráfagas en las neuronas de A10 y en la zona medial del grupo A9 (Gariano y Groves, 1988), lo que parece apoyar, como ya apuntábamos, la existencia de vías corticonigrales y el carácter excitatorio de éstas.

4.4.4.2. VÍA ESTRIATONIGRAL

Esta vía ha sido demostrada con estudios histológicos realizados con trazadores (Grofovà, 1975; Bunney y Aghajanian, 1976; Somogui, Bolam y Smith, 1981, Gerfen y col., 1982) y con registros electrofisiológicos que detectan respuestas antidrómicas en neuronas estriatales, tras la estimulación eléctrica de la SN (Ryan, Young y Groves, 1986). Las vías estriatonigral y estriatopalidal son las principales eferencias del estriado (Dray, 1979; Graybiel y Ragsdale, 1983). Se estima que entre el 30 y el 50% de las neuronas estriatales proyectan a la SN (Bunney y Aghajanian, 1976). Además, esta vía es la aferencia nigral más importante que inerva tanto la SNr como la SNC, aunque la proyección es más intensa sobre la primera (Dray, 1979). Se ha demostrado la presencia de varios neurotransmisores en esta proyección, tales como el aminoácido GABA, péptidos opiáceos y no opiáceos.

En la SN existe una alta densidad de terminales axónicas gabaérgicas (Oertel y Mugnaini, 1984) originadas en el estriado ipsilateral (Ribak, Vaughn y Roberts, 1980; Christensson-Nylander y col., 1986). Estas terminales hacen contactos sinápticos sobre células gabaérgicas de la SNr (Oertel y col., 1982) y dendritas de neuronas dopaminérgicas en la SNC y en la SNr (Van del Pol, Smith y Powell, 1985). En ambos casos, el GABA ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad espontánea de estas células

(Grace y Bunney, 1979; Waszczak, Eng y Walters, 1980; Grace y Bunney, 1985) y sobre la liberación de la dopamina estriatal (Reid et al., 1988, 1990a,b,c). De cualquier forma, los efectos inhibitorios del GABA no pueden ser atribuidos exclusivamente a la vía estriatonigral, puesto que existen otras aferencias gabaérgicas además de las células gabaérgicas propias de la SN.

La sustancia P (SP) es otro neurotransmisor que se ha relacionado con esta aferencia nigral. Existe una concentración alta de SP en la SN que puede ser casi eliminada con la lesión del estriado (Christensson-Nylander y col., 1986). Mahalik (1988) ha demostrado la existencia de contactos sinápticos entre terminales axónicas inmunorreactivas a SP y dendritas dopaminérgicas en la SNr. Aproximadamente el 25% de las dendritas de las células A9 reciben contactos sinápticos de terminales que contienen SP. La aplicación intranigral de este neurotransmisor produce un incremento de la liberación de DA en el estriado ipsilateral y disminuye la liberación en la SN (Chéramy, Leviel y Glowinski, 1981; Reid y col., 1990a,c). Adicionalmente, estos efectos pueden ser eliminados por bloqueantes de los receptores de taciquininas (Reid y col., 1990b). No obstante, Innis, Andrade y Aghajanian (1985) observaron que: a) la sustancia K (SK) tiene la misma distribución que la SP en el cerebro; b) existe mayor densidad de receptores de SK que de SP en la SN; y, c) la aplicación microiontóforética de SK estimula al 56% de las neuronas dopaminérgicas y al 47% de las no dopaminérgicas de la SN; por lo que sugieren que la vía estriatonigral debe contener SP y SK y que, posiblemente, los estudios inmunohistoquímicos deben haber medido ambos péptidos como SP por la similitud estructural entre ellos. De este modo, es posible explicar que el corte de fibras en la parte posterior del estriado reduzca a menos del 20% las concentraciones de SP y SK en la SN (Lee y col., 1986). Por otra parte, la aplicación intranigral de neuroquinina A (SK) produce, al igual que la SP, un aumento de la liberación de DA en el estriado ipsilateral (Reid y col., 1990a,c).

Por otro lado, hay evidencias de una vía estriatonigral que emplea el péptido dinorfina como neurotransmisor. Se han encontrado altas concentraciones de dinorfina en SNc, SNr y SNI (Weber, Roth y Barchas, 1982; Vicent y col., 1982 a,b; Zamir y col., 1984) y, por otro lado, se han detectado células estriatales que contienen este opiáceo (Vicent y col., 1982a,b). Distintos métodos de lesión del estriado producen una importante reducción de los niveles de dinorfina en la SN ipsilateral, sugiriendo que al menos buena parte de la dinorfina presente en ella es de origen estriatal (Vicent y col., 1982 a; Palkovits y col., 1984; Zamir y col., 1984; Christensson-Nylander, 1986). La administración por micropresión

de dinorfina a células de la SN inhibe su frecuencia de descarga, pero este efecto sólo se ha observado en neuronas no dopaminérgicas de la SNr (Lavin y García Muñoz, 1985). Por otra parte, la administración intranigral de dinorfina, causa una disminución de la liberación de dopamina en el estriado dependiente de la dosis (Reid y col., 1988; Reid y col., 1990a, c), lo que indica que este neurotransmisor puede estar implicado, directa o indirectamente, en la regulación de la actividad de las células A9. Existen, también, algunos resultados experimentales que sugieren la presencia de encefalinas en esta vía pero en menor cantidad que la dinorfina. Además, parece tomar cuerpo la idea de coexistencia de los péptidos opiáceos y no opiáceos con el GABA en la misma neurona estriatonigral (Anderson y Reiner, 1991).

La diversidad bioquímica de esta proyección, puede ser una de las razones que explique la compleja respuesta que se detecta en las células nigrales cuando se estimula eléctricamente el estriado. A esto, además, se añade el efecto indirecto sobre las A9, a través de esta proyección, sobre la SNr (Grace y Bunney, 1985). Otro factor adicional es el hecho de que el efecto de estas estimulaciones pueden modificar la vía palidonigral puesto que el globus pallidus recibe una importante inervación estriatal (Smith y Bolam, 1989, 1990). De esta forma, la estimulación estriatal produce una respuesta compleja que incluyen diferencias entre neuronas y la presencia de varios ciclos de inhibiciones y excitaciones tras la estimulación del estriado ipsilateral (Collingridge y Davies, 1980, 1981).

4.4.4.3. VÍA PÁLIDO-NIGRAL

Estudios con trazadores han mostrado la presencia de células palidales que proyectan a la sustancia negra ipsilateral. La inyección de trazadores en la SN marca cuerpos celulares en el globus pallidus (Grofová, 1975; Hattori, Fibiger y McGeer, 1975; Bunney y Aghajanian, 1976; Cartel y Fibiger, 1978; Gerfen y col., 1982; Schmued y col., 1989) y la lesión electrolítica de éste reduce dramáticamente la concentración de GAD en la SN. Este efecto no puede ser atribuido únicamente a la destrucción de la vía palidonigral, puesto que este tipo de lesiones también destruye vías estriatonigrales (Phillipson y col., 1977). No obstante, tras lesiones del globus pallidus con ácido kaínico, se detecta un gran número de fibras mielinizadas en degeneración en la SN, algunas de las cuales hacen contacto con dendritas dopaminérgicas (Wassef, Berod y Sotelo, 1981; Smith y Bolam, 1990); si bien, la mayor densidad de sinapsis se produce sobre cuerpos celulares y dendritas de neuronas gabaérgicas de la SNr (Schmued y col., 1989; Smith y Bolam, 1989, 1990). Muchas de las células del globus pallidus que proyectan a la sustancia negra también proyectan al estriado, al núcleo subtalámico y al tegmento mesopontino (Staines y Fibiger, 1984; Schmued y col., 1989), por lo que, presumiblemente, debe haber relaciones complejas entre estos centros nerviosos y la SN.

4.4.4.4. VÍA SUBTÁLAMO-NIGRAL

La existencia de proyecciones subtálamo-nigrales ha sido demostrada desde una gran variedad de metodologías (Nauta y col., 1978; Ricardo, 1980; Van der Kooy y Hattori, 1980; Gerfen y col., 1982; Hammond y Yelnik, 1983; Kita y Kitai, 1987; Groenewegen y Berendse, 1990). Alguno de estos estudios indican que las fibras subtálamo-nigrales se arborizan ampliamente en la SNr, y, de forma menos abundante, sobre la SNC (Chang, Kita y Kitai, 1984; Kita y Kitai, 1987; Parent y Hazrati, 1995). La organización topográfica de estas proyecciones incluye una transposición del eje medial-lateral del núcleo subtalámico en el eje dorsoventral de la sustancia negra (Groenewegen y Berendse, 1990).

Estudios en distintas especies han demostrado que los botones terminales de origen subtalámico en la sustancia negra muestran inmunorreactividad al glutamato (Chang, Kita y Kitai, 1984; Coles, Iles y Nicolopoulos-Stournaras, 1989). Sin embargo, los botones glutamatergicos sólo representan un 10% del total de botones sinápticos en la SNr (Rinvik y Ottersen, 1993).

Desde otras aproximaciones metodológicas, se ha intentado estudiar el efecto de esta vía sobre el funcionamiento de las neuronas nigrales. La administración de bicuculina -un antagonista gabaérgico- en el núcleo subtalámico provoca un aumento de la actividad eléctrica de las neuronas subtalámicas que se traduce en una activación concurrente de las neuronas gabaérgicas de la SNr, mientras que las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta, por el contrario, son inhibidas (Robledo y Féber, 1990; Smith y Grace, 1992). Estos datos electrofisiológicos apoyan los resultados inmunohistoquímicos previos de Smith y Parent (1988), esto es, que el subtálamo ejerce una influencia excitatoria en la sustancia negra, probablemente mediada por glutamato. De forma paralela, los mismos autores, para confirmar la naturaleza glutamatergica de la vía subtálamo-nigral, inyectaron, en la SNr, kinurenato -un antagonista de los receptores NMDA- y observaron que los efectos de la aplicación de bicuculina en el subtálamo se redujeron notablemente (Robledo y Féber, 1990). Tras la manipulación farmacológica, la estimulación eléctrica y la lesión del subtálamo, Smith y Grace (1992) llegan a la conclusión de que el subtálamo ejerce una acción dual sobre las células dopaminérgicas de la SN: 1) una inhibición inicial mediada, posiblemente, por una excitación de las neuronas de la SNr; y, 2) una facilitación de la descarga en ráfagas que podría deberse a una acción directa de las aferencias excitatorias desde el subtálamo.

Se ha detectado el efecto regulador de esta vía sobre la liberación dendrítica de DA en la SN, puesto que la estimulación eléctrica del núcleo subtalámico produce un aumento pronunciado de la liberación de DA en la SN ipsilateral (Minz y col., 1986). Por último, la lesión con iboténico o electrolítica del subtálamo produce una reducción (49-93%) de la actividad en ráfagas de las neuronas dopaminérgicas de la SNI sin afectar a su frecuencia de descarga.

4.4.4.5. VÍA RAPE-NIGRAL

La SN posee receptores para la serotonina (Marcinkiewicz y col., 1984; Pazos y Palacios, 1985), por lo tanto, debe existir alguna aferencia nigral que utilice ese neurotransmisor. Las técnicas de marcaje anterógrado han mostrado la presencia de una vía originada en el rafe dorsal, que termina en la SNc y con algo menos de intensidad en la SNr (Moore, Halaris y Jones, 1978). Esta vía está formada por colaterales de neuronas rafe-estriatales (Van der Kooy y Hattori, 1980). El efecto de la serotonina sobre las células dopaminérgicas parece ser inhibitorio. La estimulación del rafe dorsal inhibe la frecuencia de descarga de las células nigroestriatales dopaminérgicas lentas (<4 espigas/s) que, con frecuencias de estimulación de 10 espigas/seg., pueden llegar a ser inhibidas hasta en un 66% de su actividad espontánea. Sin embargo, las células con frecuencias de disparo superiores a 4 espigas/s no muestran inhibición alguna (Kelland, Freeman y Chiodo, 1991).

4.4.4.6. VÍA DESDE EL LOCUS COERULEUS

Se han publicado datos relativos a una aferencia noradrenérgica a la SN originada en el locus coeruleus. En la sustancia negra existe recaptación y liberación de noradrenalina. Estos procesos pueden ser reducidos con la administración del neurotóxico catecolaminérgico 6-OHDA en el locus coeruleus. Por otra parte, la estimulación eléctrica de este núcleo produce una respuesta bifásica en las células A9, que se inicia con una excitación para continuar con un período inhibitorio (Collingridge, James y MacLeod, 1979).

4.4.5. CONTROL DOPAMINÉRGICO DE LAS AFERENCIAS Y EFERENCIAS NIGRALES

Se ha estudiado la posibilidad de que las células A9 puedan actuar sobre las neuronas de la pars reticulata de la SN. Partiendo de los argumentos de que las dendritas dopaminérgicas se prolongan por la SNr, son capaces de liberar dopamina y de que existen receptores de dopamina en la SN que no están localizados sobre células dopaminérgicas, es razonable pensar que la liberación somática de DA puede influir sobre la actividad de neuronas no dopaminérgicas nigrales, así como sobre las terminales de vías aferentes.

La aplicación microiontoforética de dopamina aumenta la frecuencia de disparo de la mitad de las células de la pars reticulata, incluyendo entre éstas a neuronas nigrotalámicas (Ruffieux y Schultz, 1980; Waszczak y Walters, 1983). La DA, además, parece regular el efecto que el estriado ejerce sobre las células nigrales no dopaminérgicas. En concreto, la inhibición de estas neuronas inducida por estimulación estriatal puede ser disminuida por la aplicación microiontoforética de DA (Waszczak y Walters, 1986). Esta acción dopaminérgica parece estar ocasionada por la disminución de la potencia inhibitoria del GABA (Waszczak y Walters, 1983). Tanto el efecto sobre la frecuencia de descarga como sobre el efecto inhibitorio del GABA se obtienen con la liberación de la DA endógena y la inducida por la aplicación intravenosa o microiontoforética de amfetamina (Waszczak y Walters, 1986).

Barbara Waszczak, ha propuesto que esta doble función de la DA sobre las células de la pars reticulata puede estar mediada diferencialmente por dos tipos de receptores de dopamina. Utilizando la aplicación microiontoforética de agonistas específicos de ambos receptores, observó que los agonistas D1 son potentes estimuladores de la frecuencia de descarga de estas células, pero no tienen efecto sobre la inhibición por GABA ni sobre la inhibición por estimulación del estriado ipsilateral. Por otro lado, los agonistas D2 bloquean la acción inhibitoria del GABA y de la estimulación eléctrica del estriado. Además, los agonistas D2 sólo tienen efectos modestos y ocasionales sobre la frecuencia de descarga de las células de la SNr (Waszczak, 1990).

Así pues, las células de la SN parecen establecer interrelaciones funcionales tanto a través de acciones directas como actuando sobre las aferencias. De este modo, la DA puede tener efecto sobre eferencias nigrales no dopaminérgicas, puesto que, al menos, pueden modificar la actividad de neuronas nigrotalámicas. No resulta difícil imaginar que, si las células de la SNr están muy colateralizadas, estas acciones se pueden extender hasta el colículo superior y, por medio de las proyecciones descendentes, hacia el puente, aunque estos extremos no han sido demostrados.

Otros estudios han mostrado, en preparaciones *in vivo* e *in vitro*, que la dopamina puede alterar la liberación nigral de GABA (Reubi, Iversen y Jessell, 1977; Kelly, Jenner y Marsden, 1985) y 5-HT (Benkirane, Arbilla y Langer, 1987; Hery y col., 1980). Aunque en el caso de la 5-HT son necesarias grandes concentraciones de DA para que estos efectos se produzcan (Kelly, Jenner y Marsden, 1985).

4.4.6. INTERDEPENDENCIA ENTRE LOS DOS SISTEMAS NIGROESTRIATALES DOPAMINÉRGICOS

A pesar de que la mayoría de la información disponible sobre la regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas hace referencia a factores locales o aferencias ipsilaterales, existen evidencias que sugieren la influencia de estructuras contralaterales. Por ejemplo, la transección de la línea media regulariza la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Castellano y col., 1993). La aplicación de muscitol o la estimulación eléctrica de una sustancia negra, produce aumentos de recaptación de 2-deoxiglucosa en la sustancia negra contralateral, tanto en la SNr, como en la SNc (Savaki y col., 1983; Dermon y col., 1990), y modifica la probabilidad de generación de potenciales de acción de las neuronas NSDA (Castellano y Rodríguez, 1993). Así mismo, la separación de ambos hemisferios mediante la transección de la línea media, modifica tanto la frecuencia como el patrón de descarga de las NSDA (Castellano y Rodríguez, 1993).

Por otro lado, Nieoullon, Chéramy y Glowinski (1977b) han observado que 30 minutos después de la lesión electrolítica de una SN se produce un aumento en la liberación de DA en el caudado contralateral. Igualmente, se ha observado que la aplicación intranigral unilateral de DA, de agonistas o de antagonistas dopaminérgicos, es capaz de modificar la liberación de DA, no sólo en el estriado ipsilateral a la inyección sino también en el contralateral (Nieoullon, Chéramy, Glowinski, 1977b; Leviel, Chéramy y Glowinski, 1981; Ishii y Kato, 1985), así como el contenido total de DA, DOPAC y el índice de DOPAC/DA en el estriado (Ishii y Kato, 1985). Sin embargo, la aplicación de agonistas o antagonistas dopaminérgicos en un estriado no modifica la liberación del contralateral (Leviel, Chéramy y

Glowinsky, 1979). Por lo que Glowinsky y colaboradores proponen que la regulación contralateral es iniciada por la liberación dendrítica de dopamina y no por la liberación de las terminales, lo que parece indicar la participación de células nigrales no dopaminérgicas, en especial, las nigrotalámicas en este proceso. La lesión de la masa talámica intermedia produce la desaparición de los efectos contralaterales inducidos por la aplicación intranigral de agonistas o antagonistas dopaminérgicos

(Chéramy et al, 1981). Por otra parte, la estimulación eléctrica de una SN modifica la probabilidad de de generación de potenciales de acción de las neuronas NSDA (Castellano y Rodríguez, 1991).

Gerfen y col. (1982) intententaron estudiar este fenómeno desde el punto de vista anatómico, pero no llegaron a descubrir ninguna vía directa entre las dos sustancias negras. Sin embargo, por la cantidad de vías decusadas originadas en SN, proponen varios circuitos polisinápticos como posibles soportes de esta regulación contralateral. Una de estas posibles vías podría provenir del núcleo tegmental pedúnculo pontino ya que está bien establecida la existencia de extensas conexiones recíprocas entre este núcleo y la SN del mismo lado cerebral (Saper y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983; Moon Edley y Graybiel, 1983; Scarnati y col., 1984).

5. NÚCLEO TEGMENTAL PEDÚNCULO PONTINO

5.1. CITOARQUITECTURA

El núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPTg, PPT, PPN) es una agrupación entremezclada de células colinérgicas y no colinérgicas

situadas en el límite entre el cerebro medio y el cerebro posterior (Kimura y col., 1981; Armstrong y col., 1983; Woolf y Butcher, 1986; Goldsmith y Van der Kooy, 1988; Clements y Grant, 1990; Spann y Grofova, 1992).

Las primeras descripciones se realizaron a partir de la localización de células colinérgicas localizadas en el cerebro posterior de mamíferos. A este grupo de células, Mesulam (1983) lo subdivide en los grupos Ch5 y Ch6, ambos separados por la sustancia gris periacueductual. Además, observa que hay gran cantidad de células colinérgicas en la parte caudal del Ch5 y se refiere a ella como la parte compacta del Ch5, mientras que a la columna descendente del Ch5, que posee una densidad menor de neuronas colinérgicas, la denomina porción difusa del Ch5.

Siguiendo la nomenclatura de Paxinos y Watson (1986), el Ch5 comprendería el PPTg y el núcleo tegmental subpeduncular (SPTg) y el Ch6 se correspondería el núcleo tegmental laterodorsal (LDTg).

Spann y Grofova (1992), utilizando inmunohistoquímica, hacen un análisis exhaustivo de este núcleo completando las descripciones hechas hasta ese momento. Ellos encuentran células inmunorreactivas colina! acetil! transferasa (ChAT) rodeando el pedúnculo cerebral superior, a nivel de la unión pontomesencefálica. Forman un cono, cuya base se halla enfrentada a los bordes rostrales del núcleo parabrancial y con el vértice dirigido hacia la sustancia negra. No obstante, algunas de las células colinérgicas penetran en los núcleos adyacentes: en la porción caudal y dorsal de la sustancia negra (de acuerdo con los trabajos de Gould y Butcher, 1986; Martínez-Murillo y col., 1989), en el núcleo y campo retrorubral, en los polos rostrales de los núcleos parabranciales lateral y medial, en el núcleo cuneiforme, y en el núcleo tegmental subpeduncular.

5.2. DESCRIPCIÓN CITOLÓGICA

La mayoría de las neuronas colinérgicas en la subdivisión difusa del PPN -PPNd- tienden a ser más alargadas y más pequeñas que las de la subdivisión compacta. Las neuronas no colinérgicas son de tamaño variable, desde pequeñas a grandes.

Las neuronas no colinérgicas, que coinciden con las colinérgicas en forma, tamaño y ultraestructura (invaginaciones sombreadas de la membrana nuclear, cuerpos de Nissl distintivos y mitocondrias numerosas) se diferencian de éstas en el número y en el tipo de botones sinápticos. Los somas colinérgicos sólo reciben un número modesto de sinapsis y los botones redondeados son más numerosos que los pleomórficos. En contraste, los cuerpos de las células no colinérgicas están investidos por gran cantidad de terminales nerviosas y la mayoría de los botones son pleomórficos.

Las células pequeñas no colinérgicas representan una subpoblación separada morfológica y, posiblemente también, funcionalmente. En contraste con las células grandes no colinérgicas, las de soma pequeño reciben sólo algunas terminales pleomórficas y generalmente se encuentran en proximidad cerrada a los cuerpos celulares colinérgicos, algunas veces en aposición directa sin la intervención de ningún proceso dendrítico.

Rye y col., en 1987, hacen una descripción del PPN que no está del todo de acuerdo con la descrita hasta ese momento. Según ellos, lo que clásicamente se entiende por PPN se corresponde con un núcleo formado por una colección homogénea de células grandes colinérgicas en cuyos límites, en rata, aparecen entremezcladas con una población heterogénea de células pequeñas que claramente no se corresponden con el PPTn descrito previamente. Este último grupo de células, es considerado como una zona diferente del PPN y lo denominan "área extrapiramidal del cerebro medio (MEA)". Esto ha desencadenado una gran polémica y un problema terminológico, ya que no todos los autores están de acuerdo con esta descripción.

5.3. CITOQUÍMICA DEL PPN

Todos los autores parecen coincidir en que las células colinérgicas forman parte integral del PPN, no obstante, están intercaladas por una gran variedad de otras neuronas como por ejemplo glutamatérgicas (Clements y Grant, 1990).

En las células colinérgicas del PPN de rata, han sido colocadas sustancia P, atriopeptina, óxido nítrico sintetasa (Standaert y col., 1986; Vincent y col., 1983; Halliday, G.M. y col., 1990). Existe una alta densidad de receptores del factor de crecimiento de fibroblasto en la región del PPN (García-Rill y col., 1991).

Las diferencias entre las células del PPN debe considerarse a la hora de manipular este núcleo. Por ejemplo, la lesión excitotóxica del PPN lesionará a unos tipos celulares o a otros, dependiendo del neurotóxico empleado (Rugg y col., 1992).

5.4. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS

De los estudios neuroanatómicos vistos hasta ahora, se llega a la conclusión de que la región del PPN se caracteriza por la existencia de neuronas tanto colinérgicas como no colinérgicas, con tamaños y formas variables. A esta heterogeneidad hay que sumar también diferencias neuronales en sus características electrofisiológicas.

Scarnati y col., (1987) definen dos tipos de células en el PPN con diferente actividad espontánea. Las denominadas células tipo I se caracterizan por ser lentas (0,5-8 espigas/s) y por una forma de onda trifásica, de 3 a 4 ms de duración y que descargan con un patrón regular. Las células tipo II se caracterizan por ser más rápidas que las

anteriores (10-20 espigas/s), su forma de onda es bifásica con una duración de 1,5 a 3 ms y descargan con periodos de ráfagas caracterizados por una disminución de la amplitud del potencial según avanza. Las células tipo II suelen encontrarse ventrales a las células de tipo I.

Leonard y Llinás (1988) en función de las características electrofisiológicas de membrana distinguen tres tipos neuronales en el PPN: a) células "LTS" que presentan estigas de calcio de bajo umbral; B) células "A" en las que se pueden activar intensas corrientes A de potasio; y, c) células "A+LTS" que presentan ambas características. Kang y Kitai (1990) usando también las características de membrana, clasifican a las neuronas del PPN en tres tipos: el tipo I son aquellas que sólo mostraron corrientes de calcio de bajo umbral; las de tipo II que se corresponderían con las "A" y "A+LTS" de Leonard y Llinás y tipo III, aquellas que no mostraban la corriente tipo A ni la de calcio de bajo umbral. Las células tipo I y tipo III no son colinérgicas y al menos el 50 % de las células tipo II son colinérgicas. Tras la estimulación de la SNr se observaron PIPs en los tres tipos de células que generalmente eran seguidos por un potencial despolarizante que disparaba espigas rebote en las células tipo I y II. Las células del tipo II se localizan, por lo general, en la zona clásicamente definida como PPN (agregado de células colinérgicas), mientras que las de tipo I y II se encuentran, además, en el MEA de Rye y col.. Las células del tipo II son medianas o largas con forma fusiforme o poligonal mientras que las del tipo I y III son más pequeñas.

5.5. AFERENCIAS AL PPN

Las aferencias al PPN proceden, mayoritariamente, de elementos de los ganglios basales, del sistema límbico y de la formación reticular. Los problemas para distinguir las aferencias a neuronas colinérgicas de las de no colinérgicas y el problema terminológico suscitado por Winer y

col. (Rye y col., 1987; Steininger y col., 1992), quienes utilizan el término PPTg para referirse sólo a las células colinérgicas y MEA para las células no colinérgicas de este área, han contribuido a dificultar el establecimiento de las conexiones al PPN. Además, según ellos, estas zonas no difieren sólo en los tipos neuronales. Funcionalmente, el MEA está asociado con aferencias procedentes del cerebro anterior y el medio; mientras que las neuronas colinérgicas estarían asociadas, principalmente, con el sistema reticular ascendente. Algunos autores han mostrado su desacuerdo con esta distinción (Spann y Grofova, 1992; Steckler y col., 1994), entre otras razones, porque las neuronas colinérgicas y no colinérgicas del PPTg están generalmente intercaladas unas con otras (Swanson y col., 1987).

5.5.1. AFERENCIAS DESDE EL CEREBRO ANTERIOR

Existen resultados contradictorios en lo referente a las aferencias del PPN procedentes de los ganglios basales. Moriizumi y Hattori (1992) encuentran que las neuronas de la parte caudal, pero no las de la parte ventral, del globo pálido proyectan al PPN. Esta vía es gabaérgica y termina sobre las neuronas colinérgicas. Otros autores describen las aferencias del pálido, como procedentes del pálido ventral (Semba y Fibiger, 1992; Spann y Grofova, 1992). Según Steininger y col. (1992) las aferencias originadas en los ganglios basales llegan a las neuronas no colinérgicas (a las que ellos llaman MEA) y no al PPN.

Parecen existir aferencias desde el núcleo subtalámico (Spann y Grofova, 1992; Jackson y Crossman, 1983). Esta vía posiblemente sea de carácter excitatorio (Granata, A.R. y Kitai, S.T., 1989).

Llegan aferencias desde la corteza motora y premotora, desde el hipotálamo y el núcleo parafascicular del tálamo (Semba y Fibiger,

1992; Spann y Grofova, 1992). Las aferencias hipotalámicas proceden del área hipotalámica lateral y los núcleos paraventricular y preóptico (Steininger y col., 1992). La zona incerta y el núcleo del tracto solitario, ambos asociados con la función hipotalámica, también proyectan al PPTg.

Cabe la posibilidad de una llegada colinérgica desde la sustancia innominada (complejo del núcleo basal magnocelular) (Semba y Fibiger, 1992; Steininger y col., 1992; Spann y Grofova, 1992).

5.5.2. AFERENCIAS DESDE EL CEREBRO MEDIO

Existe gran cantidad de aferencias desde la SNr (Granata y Kitai, 1991; Spann y Grofova, 1991). Los botones de origen nigral contienen vesículas pleomórficas (PV) y numerosas mitocondrias y hacen contactos sinápticos simétricos con cuerpos celulares y dendritas. Las fibras nigrales representan el mayor sistema de aferencias del PPNd; casi con toda seguridad se puede concluir que una gran proporción de los botones PV tienen origen en la sustancia negra. Los botones PV se encuentran en los contactos colinérgicos y no colinérgicos, variando el patrón de inervación de los diferentes tipos de somas neuronales. En particular, las únicas células que reciben una cantidad sustancial de llegadas axosomáticas por terminales PV son las neuronas largas no colinérgicas. Las llegadas sinápticas desde la sustancia negra parecen estar distribuidas esencialmente sobre las dendritas (Spann y Grofova, 1992). La influencia de la SN sobre el PPN puede ser tanto excitatoria como inhibitoria. En gatos descorticados, estas respuestas excitatorias disminuyen notablemente, mientras que las respuestas inhibitorias no se ven afectadas (Scarnati, E. y col., 1987).

El PPN recibe algunas proyecciones desde el colículo superior ipsilateral, procedentes de las capas profundas del colículo. Igualmente al MEA llegan aferencias del colículo, pero desde el lado contralateral y de las capas (Steininger y col., 1992). Estas capas intermedias del colículo superior, a su vez, reciben aferencias de la SNr (May y Holl, 1984). También llegan aferencias desde el ATV (Semba y Fibiger, 1992; Spann y Grofova, 1992).

5.5.3. AFERENCIAS DESDE EL CEREBRO POSTERIOR

Los núcleos del rafe dorsal y central superior envían proyecciones al PPN (Steininger y Wainer, 1991; Steininger y col., 1992; Semba y Fibiger, 1992; Spann y Grofova, 1992) y al MEA (Semba y Fibiger, 1992; Spann y Grofova, 1992), indicando una posible interrelación serotoninérgica-colinérgica en este nivel.

Existe una aferencia colinérgica procedente del PPTg contralateral y desde el LDTg ipsi y contralateral (Fibiger y Semba, 1988). Hay también aferencias desde el campo tegmental central, de los campos reticulares pontino y medular (Spann y Grofova, 1992).

Por último, se ha observado una proyección bilateral densa, con dominancia ipsilateral, desde el campo tegmental central. También existen aferencias desde la formación reticular medular y desde la sustancia gris periacueductal (Steininger y col., 1992).

5.6. EFERENCIAS

Las eferencias del PPTg pueden dividirse en ascendentes y descendentes con la contribución de neuronas colinérgicas y no colinérgicas a ambas. Aunque algunas neuronas del PPTg mandan sólo proyecciones ascendentes o descendentes (Spann y Grrofova, 1989), otras se colateralizan y mandan proyecciones en ambas direcciones.

5.6.1. EFERENCIAS DESCENDENTES

Las proyecciones descendentes forman parte de la formación reticular medial, e inervan el núcleo pontino, el vestibular, el núcleo cerebelar profundo (Woolf y Butcher, 1989) y la médula espinal (Jackson y Crossman, 1983). Estas proyecciones descendentes están muy colateralizadas (Rye y col., 1988) y son tanto colinérgicas (Rye y col., 1988) como no colinérgicas (Goldsmith y Van der Kooy, 1988; Sofroniew y col., 1985). Alrededor del 10% de las neuronas colinérgicas del PPTg proyectan a la médula rostral ventrolateral, que ha sido asociada con el control de la presión sanguínea (Yasui y col., 1990), y un 10% proyectan a la médula medioventral. Hay también conexiones colinérgicas con el núcleo del rafe y con el locus coeruleus (Woolf y Butcher, 1989).

5.6.2 EFERENCIAS ASCENDENTES

5.6.2.1. EFERENCIAS AL CEREBRO ANTERIOR

La mayoría de las proyecciones colinérgicas ascendentes establecen sinapsis en el tálamo (Hallanger y col., 1988; Rye y col., 1987; Sofroniew y col., 1985). Así, el grupo de células colinérgicas Ch5 proyecta sobre todos los núcleos talámicos pero,

fundamentalmente, sobre los núcleos geniculado medial, geniculado dorsolateral y al tálamo lateral (Hallanger y col., 1988).

Las neuronas colinérgicas del PPTg, también proyectan a regiones frontales y al septum dorsal y lateral (Hallanger y col., 1988). Existe una proyección densa desde el PPTg al hipotálamo lateral (Woolf y Butcher, 1985).

También parten eferencias hacia los núcleos globo pálido/entopeduncular y hacia el núcleo subtalámico (Canteras y col., 1990; Jackson y Crossman, 1983; Woolf y Butcher, 1985). La naturaleza de los neurotransmisores relacionados en estas proyecciones ha motivado intensos debates; sin embargo, parece que la mayoría de estas proyecciones son no colinérgicas si bien existe algunas colinérgicas (Lee y col., 1988; Mesulam y col., 1983; Rye y col., 1987, 1988).

Aunque algunas neuronas colinérgicas proyectan a los núcleos amigdalinos medial, basolateral y central, la mayoría de las proyecciones amigdalinas desde el PPTg, son no colinérgicas (Hallanger y col., 1988).

5.6.2.2. EFERENCIAS AL CEREBRO MEDIO

El PPN proyecta a la SN ipsilateral. No obstante la mayor innervación parece producirse sobre la SNc (Scarnati, E. y col., 1984; Beninato, M. y Spencer, R:F., 1988). También se han descrito proyecciones procedentes del PPN contralateral (Saper, C.B. y Loewy, A.D., 1982; Jackson, A. y Crossman, A.R., 1983; Moon Edley, S. y Graybiel, A.M., 1983; Scarnati, E. y col., 1984). Las eferencias del el PPTg a la sustancia negra, contienen porciones colinérgicas y no colinérgicas. Estudios anatómicos (Saper y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983; Parent y De Bellefeuille, 1983; Scarnati y col., 1987a) y electrofisiológicos (Scarnati y col., 1984, 1987b) han mostrado que las neuronas del PPN proyectan a la SNc así como a la SNr (Scarnati E. y col., 1984; Beninato, M. y Spencer, R:F., 1988). Los axones que van desde el PPN hasta la SNc parten a través de la porción lateral de la formación reticular del cerebro medio, dan la vuelta ventralmente, y cursan medialmente a lo largo de la superficie dorsal de la SNc (Saper y Loewy, 1982). Las terminales axónicas

del PPN contienen vesículas sinápticas redondas (Scarnati y col., 1988) y forman contactos sinápticos asimétricos con las ramas y espinas dendríticas de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Tokuno y col., 1988).

Los estudios electrofisiológicos sugieren que las aferencias del PPN sobre la SNc son excitatorias y utilizan glutamato como posible neurotransmisor (Scarnati y col., 1986; Di Loreto y col., 1992). Lee y col. (1988) y Sugimoto y Hattori (1984), demostraron que neuronas no colinérgicas del PPN, posiblemente glutamaérgicas, establecen sinapsis en la SNc.

También existen estudios anatómicos y electrofisiológicos que indican la existencia de proyecciones colinérgicas a las neuronas dopaminérgicas de la SNc desde el PPN. Por una parte, han sido encontradas en el PPN neuronas ChAT inmunopositivas (Armstrong y col., 1983; Sugimoto y col., 1984; Satoh y Fibiger, 1985; Sakai y col., 1986; Standert y col., 1984; Rye y col., 1987; Spann y Grofova, 1992) y que expresan ARNm ChAT (Vilaro y col., 1992; Lauterborn y col., 1993). La SNc también se marca intensamente con inmunohistoquímica para la acetilcolinesterasa (Jiménez-Castellanos y Graybel, 1987). En los somas y en las dendritas de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, se han encontrado receptores nicotínicos (Clarke y Pert, 1985; Clarke y col., 1985; Schwartz, 1986; Deutch y col., 1987; Wada y col., 1989; Naeff y col., 1992) y muscarínicos (Cortes y Palacios 1986; Cortes y col., 1986; Mash y Potter, 1986; Schwatz, 1986; Wang y col., 1989; Vilaro y col., 1990, 1992; Weiner, 1990). Henderson y Greenfield (1987) observaron botones terminales ChAT positivos en la SNc. Gould y col. (1989) describieron que la inyección de leucoaglutinina *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) en el PPN, marcaba botones terminales PHA-L y ChAT positivas. Mediante estudios ultraestructurales se ha demostrado que las terminales ChAT positivas forman sinapsis asimétricas con las dendritas de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Beninato y Spencer, 1987, 1988; Martínez-Murillo y col 1989a; Bolam y col., 1991; Henderson y Sherrif, 1991).

Existe algunas evidencias de otras proyecciones mesencefálicas del PPN como es el caso de proyecciones colinérgicas al colículo superior (Beninato y Spencer, 1986) y al ATV (Jackson y Crossman, 1983).

5.7. INFLUENCIA SOBRE LA SN

Como decíamos anteriormente, en la SN existen numerosos receptores para la acetil colina, tanto nicotínicos como muscarínicos. Son numerosos los trabajos en los que se estudian los efectos de diferentes agonistas y antagonistas para ambos tipos de receptores sobre la actividad de las neuronas NSDA.

Algunos experimentos electrofisiológicos han demostrado que la administración sistémica (Grenhof y col., 1986) o iontoforética (Lichesteiger y col., 1982) de nicotina aumenta la frecuencia de descarga de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Esta acción puede ser bloqueada por la aplicación del bloqueante de los receptores nicotínicos, mecamilamina (Clarke y col., 1985b; Grenhof y col., 1986). También se han observado efectos modulados por los receptores muscarínicos. Lancey y col. (1990) observaron que la aplicación de muscarina causa una despolarización de la membrana y un incremento de la frecuencia de descarga, estos efectos pudieron ser antagonizados por pirenzepina (antagonista muscarínico). La estimulación del PPN por la microinyección de kainato produce un aumento de la actividad extracelular unitaria de las neuronas dopaminérgicas de la SNc que fué antagonizado por la mecamilamina (Clarke y col., 1987). No obstante, es posible que estas acciones colinérgicas no sean homogéneas en toda la extensión de la SN. Así, por ejemplo, Hernández-López y col. (1994) encontraron efectos opuestos en de la estimulación colinérgica sobre la conducta rotacional de ratas y en la liberación estriatal de DA, en función de que la estimulación se hiciera en la parte rostral o caudal de la SNc. La microinyección de carbacol (agonista colinérgico) en la porción más caudal de la SNc indujo rotaciones contralaterales asociadas con una liberación de DA en el estriado. Por el contrario, encontraron rotaciones ipsilaterales acompañadas de una reducción de la liberación de DA estriatal cuando aplicaron la misma dosis de droga en la porción más rostral de la SNc..

La estimulación eléctrica del PPN produjo dos tipos de excitaciones en las células de la SN (SNc y SNr): uno de latencia más corta ($3,7 \pm 1,9$ ms) y también de menor duración ($2,9 \pm 1,6$ ms) (Scarnati y col., 1986; Scarnati y col., 1987; Di Loreto y col., 1992) que el otro (latencia: $5,2 \pm 1,8$ ms; duración: $13,0 \pm 3$ ms) (Scarnati y col. 1987). . Tras la destrucción del subtálamo el segundo tipo de excitación disminuyó considerablemente y aparecieron respuestas inhibitorias. La mayor parte de las células que se excitaban pertenecían a la parte más caudal de la SN. Ambos tipos de excitaciones eran seguidas por un periodo de 10-30 ms de inhibición de la actividad basal pero que desaparecía si se volvía a estimular desaparecía (Scarnati y col., 1984). La respuesta excitatoria de latencia corta en las neuronas de la SN no depende de vías corticofugales, la duración de la respuesta y la latencia hacen pensar que esta respuesta se debe a la estimulación de una vía monosináptica (Scarnati y col. 1987).

5.8 PROCESOS EN LOS QUE ESTÁ IMPLICADO EL PPN

El PPN está considerado como parte integrante de la región mesencefálica motora por su relación con la actividad motora, el tono muscular y por la interdependencia funcional con los ganglios basales y la SN. La estimulación química o eléctrica del PPN induce movimientos motores (García-Rill, 1983a, 1983b, 1983c, 1985) y reduce o estimula el tono muscular dependiendo de la frecuencia de estimulación eléctrica (Kelland y Asdourian, 1988). Igualmente, se ha observado una activación rítmica del PPN durante la locomoción (García-Rill, 1983d) o que la alteración de las aferencias gabaérgicas al PPN produce posturas asimétricas y conducta rotacional (Kilpatrick y Starr, 1981; Childs y Gale, 1984). Adicionalmente, la lesión bilateral del PPN hace desaparecer la catalepsia y la depresión locomotora inducida por morfina (Olmstead y Franklin, 1994).

Por otra parte, las salidas ascendentes colinérgicas desde el PPN hasta el tálamo han sido relacionadas con funciones facilitadoras de la transmisión tálamo-cortical implicadas en la desincronización de E.E.G. y de ondas ponto-genículo-occipitales del sueño R.E.M. (Livingston, M.S. y Hubel, D.H., 1981; Rye, D.B. y col., 1987; Sofroniew, M.V. y col., 1985; Granata, A.R. y Kitai, S.T., 1989).

Adicionalmente, el PPN se ha involucrado en de adquisición de aprendizajes asociativos (Bubser y Koch, 1994) e instrumentales (Inglis y col., 1994), así como en la adquisición de lugares asociados a la administración de morfina o de D-anfetamina (Bechara y Van der Kooy, 1989). El PPN, también, se ha relacionado con las convulsiones epilépticas provocadas por la pilocarpina (De Sarro y col., 1992) y con la nocicepción (Jackson y Crossman, 1983).

Por último, en humanos, este núcleo parece estar implicado en diferentes desórdenes neurológicos y psiquiátricos. Existen distintos estudios que demuestran una pérdida de neuronas colinérgicas del núcleo tegmental pedúnculo pontino en la enfermedad de Parkinson (Hirsch y col., 1987; Zweig y col., 1989; Halliday y col., 1990; Pare y col., 1990; Jellinger, 1991), en la demencia senil tipo Alzheimer (Jellinger, 1991) y en la aplasia supranuclear progresiva (Hirsch y col., 1987; Zweig, 1987; Jellinger, 1988), y un aumento aparente de estas neuronas en la enfermedad de Parkinson (Karson y col., 1991).

MATERIAL Y MÉTODO

1. ANIMALES Y AMBIENTE

En los trabajos que se describen a continuación, se utilizaron ratas macho Sprague Dawley (200-350 gr.) obtenidas del Animalario Central de la Facultad de Medicina (Univ. La Laguna), mantenidas con un ciclo luz oscuridad 12:12 hr, libre acceso a agua y dieta estandar de laboratorio. Se las dispuso en grupos de 3-4 animales por jaula ó 1 animal por jaula si estaban recién operadas. La temperatura del animalario se mantenía constante a 20-22°C. Las manipulaciones experimentales se realizaban siempre en el mismo momento del ciclo luz-oscuridad.

2. REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EXTRACELULAR

2.1. PREPARACIÓN DEL ANIMAL PARA EL REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO.

En primer lugar se procedía a anestésiar a la rata mediante la administración intraperitoneal de una dosis de 400 mg/Kg de hidrato de cloral (Acofar) disuelto en ringer lactato al 8% p/v.

Con el fin de mantener al animal completamente dormido durante toda la sesión de registro, se le colocaba una cánula intraperitoneal para la administración de dosis suplementarias, cada dos horas o antes, si se presentaban síntomas de sensibilidad al tacto (retirada de la pata al ser estirada). Estas dosis suplementarias eran de 1/10 a 1/5 parte de la dosis administrada inicialmente.

Tras la anestesia se rasuraba la zona a cortar y el animal era colocado en el estereotáxico. La temperatura de la rata se controlaba mediante una sonda rectal (Panlab 0331) y mientras un circuito con agua circulante termostatizada que contactaba con el cuerpo del animal, se

mantenía su temperatura constante e tre 36-38 °C durante toda la intervención.

Seguidamente, se realizaba una incisión longitudinal del cuero cabelludo y se trepanaba el cráneo en aquellos lugares dónde se iba a introducir el electrodo de registro, el de estimulación ó/y la aguja o la cuchilla en aquellos experimentos en los que había que realizar una lesión.

Para la estimulación eléctrica de la cabeza del núcleo caudado y del núcleo pedúnculo pontino, se colocaban, en cada núcleo, unos electrodos concéntricos de acero inoxidable (SNE-100, Rhodes Medical Instruments) de 6 cm de largo, de 400 micrómetros de diámetro externo, 400 micrómetros de separación entre los polos, sin aislante en sus puntas. Las coordenadas utilizadas para la estimulación de la cabeza del caudado fueron: 8,6 mm anterior a lambda, 3,2 mm lateral a la línea media y 5 mm ventral a la superficie de la duramadre, siguiendo el atlas de Paxinos y Watson (1986).

Para el registro de la actividad eléctrica de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales, se utilizaron pipetas de vidrio, construídas en un estirador de pipetas (Narishigue PE-2), a partir de tubos de borisilicato de 1,5 mm de diámetro externo y 0,84 mm de diámetro interno, con un filamento interno (WPI 1B150F-4). Estas pipetas se rellenaban con 1% de Azul pontamina (Pontamine Sky Blue 6BX, BDH) en CNa 2M y se colocaban en un portaelectrodos que actuaba como interfase entre la solución electrolítica y un conductor metálico a través de un puente de Ag-AgCl (WPI MEH3S-1,5). El electrodo así colocado se sujetaba a un micromanipulador hidráulico (Narishigue MO-8) acoplado a una de las tres torres del estereotáxico (Narishigue SM-15), permitiendo su movimiento en el eje dorso-ventral muy lentamente, a distancia del resto del sistema, evitando, de esta manera, tocar elementos sujetos al estereotáxico. En este eje dorso-ventral, hacíamos recorridos a partir de 5,5 mm desde la superficie de la duramadre. El estereotáxico utilizado permitía, además, el control anteroposterior con resolución de 10 mm (Narishigue SM-15M). El recorrido anteroposterior iba desde 2,8 a 3,5 mm anterior a lambda y el lateral desde 1,8 hasta 2,2 mm lateral a la línea media.

2.2. LOCALIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

Una vez situado en las coordenadas adecuadas, se bajaba lentamente el electrodo de registro y se iban observando las señales obtenidas y escuchando los sonidos del audioamplificador. Si se encontraba una neurona, se procedía a comprobar si cumplía todos los criterios que caracterizan a las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, es decir, que la forma de la onda fuera bifásica o trifásica de duración superior a 2,5 ms, con una primera fase positiva y una pronunciada fase negativa. Incluso antes de visualizar esta forma de onda, es posible localizar a estas neuronas porque producen en el audioamplificador un sonido característico, diferente del de otras células de la zona.

Si cumplía el criterio anterior, comprobábamos la frecuencia y el patrón de descarga (menos de 11 espigas por segundo) y a continuación procedíamos a estimular el estriado ipsilateral para comprobar que respondía antidrómicamente, es decir:

- 1.- Que por cada estímulo apareciera siempre una respuesta (relación 1:1).
- 2.- Que entre el inicio del artefacto del estímulo y el inicio de la respuesta la latencia permaneciera constante.
- 3.- Que siguiera apareciendo esa respuesta al estimular a alta frecuencia (50 Hz de frecuencia o duración de los intervalos entre las estimulaciones de 20 ms).
- 4.- Que se pudiera producir colisión entre esta respuesta antidrómica y un potencial de acción espontáneo, cuando la demora entre el PA espontáneo y la aplicación del estímulo era inferior a la latencia antidrómica.
- 5.- Que la velocidad de conducción fuera de 0,4-0,7 m/s. Para ello nos

basábamos en la fórmula:

$$\frac{\sqrt{(A-a)^2 + (L-l)^2 + (V-v)^2}}{\text{ms de latencia}}$$

A, L, V = coordenadas (mm) del electrodo de estimulación, anterior, lateral y ventral respectivamente; a, l, v = las mismas coordenadas pero de la micropipeta de registro.

Si la neurona encontrada cumplía todos estos criterios, se consideraba que era una neurona dopaminérgica nigroestriatal y se comenzaba su registro.

2.3. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS NIGROESTRIATALES

La señal eléctrica captada por el electrodo y transmitida al portaelectrodos pasaba (Fig. 1):

1º) A un preamplificador (Grass P-15) de alta impedancia de entrada, wado muy cerca la pipeta, para impedir que se perdiera la señal antes de poder amplificarla. Además, este preamplificador también hacía una primera amplificación de la señal.

2º) Del preamplificador, la señal pasaba a un sistema que amplificaba, filtraba y discriminaba el nivel de voltaje (Proan-1, Direlec):

- La amplificación la adaptábamos entre 3000 y 10000 Hz, dependiendo de la amplitud de la señal.

- El filtro paso banda se estableció, por lo general, entre 100-3000 Hz.

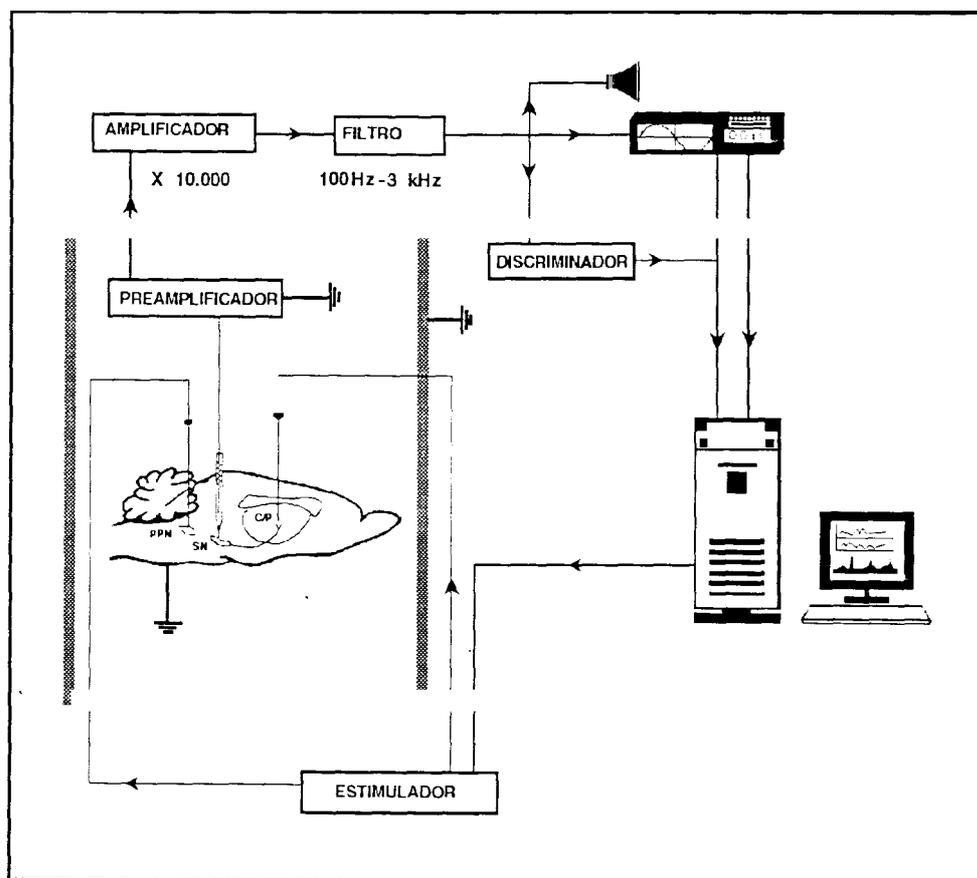


Figura 1. Esquema del sistema de registro y procesamiento de la actividad electrofisiológica unicelular empleado en el estudio de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales.

- Se utilizaron dos discriminadores de nivel conectados por una unidad digital externa realizada al efecto, con el fin de transformarlos en un discriminador de ventana de amplitud de voltaje. Este discriminador de ventana, nos permitía poder aislar los potenciales de acción de los artefactos provocados por la estimulación eléctrica, dando como salida un pulso cuadrado que podía ser enviado al ordenador y que éste interpretaba como ocurrencia de un potencial de acción.

3°) La señal analógica amplificada y filtrada, también se enviaba a una unidad de audioamplificación (Physiorec-3, Cibertec) que permitía grabar la señal en un vídeo convencional. Al mismo tiempo, la señal analógica y los pulsos de salida del discriminador de nivel eran recogidos en un osciloscopio A/D (Tektronic 2230) que nos permitía realizar medidas muy precisas de tiempo y voltaje, así como almacenar hasta 28 formas de onda digitalizadas. La información almacenada de esta manera podía ser enviada al ordenador, a través de una tarjeta GPIB, o ser recuperada en el propio osciloscopio, con lo que podíamos medir, con más precisión aún, las características de la forma de onda y las latencias antidrómicas.

4°) Al tiempo que se observa la actividad en el osciloscopio, se almacena en el ordenador (ITS 286 con un reloj de 8-12 Mhz, con disco duro de 20 Mbytes, monitor color EGA, 2 Mbytes de memoria RAM, una unidad de disco de 1,2 Mbytes; ampliado con la tarjeta Lab-Master que dispone de 5 relojes de 1 Mhz, 5 contadores de 16 bytes, conversión A/D, D/A así como salidas y entradas digitales).

Tanto para la adquisición como para el procesamiento y análisis matemáticos de la actividad neuronal; utilizamos un paquete de programas diseñados en nuestro laboratorio. Este paquete fué programado en lenguaje True-basic (que permitía utilizar un segmento de datos abarcando la memoria RAM disponible hasta 640 Kbytes), acompañado de varias subrutinas en lenguaje ensamblador (imprescindible para obtener la máxima resolución temporal posible) que fue empleado fundamentalmente para programar interrupciones, control y lectura de relojes y activación del estimulador. El sistema de adquisición

estaba gobernado por interrupción de hardware, lo que permitía que el ordenador pudiera trabajar a tiempo compartido en sus tareas sin perder resolución temporal. Concretamente, el funcionamiento del ordenador estaba controlado por la propia actividad neuronal, ya que, la llegada de un PA al ordenador, a través de la línea de interrupción IRQ7, hacía que el ordenador abandonase temporalmente su tarea. En ese momento, comenzaba a ejecutarse un programa residente encargado de leer dos relojes de 1 Mhz que indicaban el tiempo transcurrido desde el último potencial de acción, asignara este valor a una variable y obtuviera el tiempo relativo de este evento en relación a una estimulación eléctrica aplicada, con un error inferior a los 20 ms.

El programa principal utilizaba estos valores para obtener índices de la producción de potenciales de acción acumulados en intervalos de tiempo previamente establecidos.

Por otra parte, los valores por defecto del programa pueden ser modificados al inicio del mismo como número de fases experimentales, duración de las mismas, fases en las que se aplicarán estimulaciones eléctricas y frecuencia de las mismas, duración de los intervalos de acumulación y criterios de inicio y fin de ráfaga.

Los parámetros que se obtienen con el programa son:

a) Potenciales de acción por segundo.

b) Actividad en ráfagas: el ordenador interpretaba inicio de una ráfaga cuando ocurría un intervalo interespiga inferior a 80 ms dándola acabada al encontrarse un intervalo interespiga superior a 160 ms tal y como se viene realizando desde el trabajo de Grace y Bunney de 1984. De esta manera obteníamos: el número de ráfagas por segundo, el número de potenciales de acción dentro de ráfagas por segundo y el histograma de ráfagas, según el número de PA que contenían.

c) Potenciales de acción que no pertenecen a una ráfaga, por segundo.

- d) Media y desviación estándar (S_x) de los intervalos interespigas (ms).
- e) Coeficiente de variación de los intervalos interespigas (expresado como proporción S_x/x).
- f) Histogramas periestímulo con resolución de 1 ms.

Todos estos parámetros, al tiempo que se obtenían, aparecían representados en la pantalla del ordenador. Por otra parte, también se construía el histograma de intervalos interespiga con resolución de 10 mseg, así como una matriz donde se recogían todos los intervalos interespigas del registro.

El intervalo de muestreo se estableció en 10 segundos, con lo que disponíamos de 6 puntos por minuto de cada uno de los parámetros, con la excepción de los histogramas que obteníamos uno por cada fase experimental.

Al comenzar registrábamos, durante los cuatro primeros minutos, la actividad espontánea de la neurona y a continuación el ordenador mandaba la señal al estimulador eléctrico para que éste comenzara a estimular.

Durante el registro el volumen del audioamplificador se ponía a 0 para evitar estímulos sonoros. El buen funcionamiento del sistema se controlaba observando el osciloscopio y la pantalla del ordenador.

Cuando habíamos obtenido unos 1500 potenciales de acción con unas 400 estimulaciones aproximadamente, parábamos el programa y grabábamos el registro, se etiquetaba y clasificaba junto a las anotaciones hechas durante el mismo: coordenadas de localización, latencia de la respuesta antidrómica e incidencias. Seguidamente, se pasaba a realizar otros trayectos en la ventana de muestreo, con el fin de localizar otra célula.

Una vez que se daba por terminada la sesión de registro se procedía al marcaje de los electrodos y perfusión del animal.

3. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DEL REGISTRO REALIZADO

El histograma periestímulo, resultado de la acumulación de potenciales de acción según su latencia de aparición, en relación a las estimulaciones, desde 200 ms antes hasta 800 ms después de cada una de ellas, era importado a un programa en el que era analizado. Este programa permitía calcular y trazar una línea con el valor medio de la actividad de la célula durante el periodo previo a la estimulación. De esta manera y mediante el trazado de la media móvil, se podía observar, con facilidad, cualquier efecto que producía la estimulación eléctrica. Así, en los casos en los que la estimulación no producía efectos sobre la actividad de la neurona registrada, el histograma obtenido consistía en una línea paralela al eje x. Todo intervalo temporal en el que los valores se hallasen claramente por encima o por debajo de esta línea base, se interpretaban como excitaciones o inhibiciones resultados de la estimulación eléctrica. Por lo tanto, podíamos elegir aquellos segmentos en los que se observaba una modificación y al sustraer el nivel base esperado, calcular: su latencia de inicio, duración e intensidad de la misma, es decir, potenciales de acción modificados (inducidos o suprimidos) por estímulo y área de la respuesta.

Para el análisis estadístico de los valores obtenidos, tanto del histograma periestímulo como de la frecuencia y modelo de descarga de cada neurona se utilizó el paquete SPSS para Window (1989-1992). Los test aplicados se especifican en cada experimento.

4. MÉTODOS HISTOLÓGICOS

Una vez terminados los registros en un animal se marcaban las zonas en que se encontraban los electrodos de registro y de estimulación. Para ello se pasaba una corriente de 50 nA durante 50 segundos a través del

el electrodo de estimulación. En cuanto a la micropipeta, se hacía pasar a través de ella una corriente de -50 nA, durante 15-20 minutos con el fin de producir un depósito de Azul de Pontamina en la zona donde fue registrada a última neurona.

Posteriormente, tras administrar a la rata una dosis letal de hidrato de cloral se procedía a su perfusión por vía intracardiaca con:

1- 60 ml de solución salina heparinizada a 36-38°C., con el fin de eliminar a sangre.

2.- 150-200 ml de ferrocianida de potasio al 1% (p/v) en formaldehído al 10%. La formalina hacía las funciones de fijador del tejido mientras que la ferrocianida de potasio marcaba de azul el hierro depositado por los electrodos de estimulación al paso de la corriente.

Posteriormente se extraía el cerebro y se sumergía en una solución de formaldehído al 10% y sacarosa al 10%. El porcentaje de sacarosa de esta solución se incrementó al 20% y posteriormente al 30% para crioproteger los cerebros.

4.1. CONGELACIÓN Y CORTE DEL TEJIDO

En primer lugar, los cerebros eran congelados a una temperatura comprendida entre -16 y -23 °C. Seguidamente se hacían cortes seriados coronales, horizontales o sagitales de 40 µm de grosor en un criostato (Leica, Cryocut 1800). Estos cortes eran montados sobre portaobjetos gelatinizados (0,005% -p/v- de alumbre de cromo -Merk- 1036- en 0,5% - p/v- de gelatina - Merk- 4078- en agua destilada) y se dejaban secar a temperatura ambiente durante unas 18-24 horas.

4.2. TINCIÓN

Los cortes fueron teñidos con el método violeta de cresilo según Paxinos y Watson (1986):

- 5 minutos en xilol
- 5 minutos en xilol
- 5 minutos en alcohol de 100°
- 5 minutos en alcohol de 100°
- 5 minutos en alcohol de 96°
- 5 minutos en alcohol de 70°
- lavado con agua destilada

- 10 minutos en violeta de cresilo: 0,5% p/v de violeta de cresilo (Sigma) en una solución 0,1 M de acetato sódico y 0,1 M de ácido acético en agua destilada
- 5 minutos en agua destilada
- 5 minutos en alcohol de 70°
- 5 minutos en alcohol de 96°
- 5 minutos en alcohol de 100°
- 5 minutos en alcohol de 100°
- 5 minutos en xilol
- 5 minutos en xilol

Tras la aplicación de este protocolo, se colocaban los crubreobjetos utilizando como medio de inclusión Eukitt (Merck). La visualización de los cortes se hizo con luz transmitida en un microscopio óptico (Leitz Diaplan).

1. EXPERIMENTO 1

Efecto de la hemitransección anterior o posterior a la sustancia negra sobre la actividad espontánea de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales.

1.1. OBJETIVOS

Con el fin de hacer un primer acercamiento al estudio de la regulación que las aferencias ejercen sobre la actividad espontánea de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales comparamos el efecto inducido por la eliminación de las aferencias anteriores con respecto al que tiene lugar tras la eliminación de las aferencias posteriores. Para ello, se hizo un análisis de las características electrofisiológicas de la actividad espontánea de tres grupos experimentales de neuronas dopaminérgicas (neuronas de ratas sin hemitransección, neuronas de ratas con hemitransección anterior a la sustancia negra y neuronas de ratas con hemitransección posterior a la sustancia negra). Los objetivos fueron:

- 1) Comparar nuestros resultados, en animales intactos, con los obtenidos en los trabajos en los que se han identificado electrofisiológicamente estas células.
- 2) Comprobar si se producen cambios en la actividad electrofisiológica espontánea de las células dopaminérgicas nigroestriatales tras la hemitransección anterior o posterior a la sustancia negra en comparación con las neuronas de ratas intactas.

1.2. MATERIAL Y MÉTODO

1.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental elegido para la realización de este primer experimento estaba constituido por una variable independiente intergrupo con tres niveles (control, hemitransección anterior, hemitransección posterior). Se registró la actividad espontánea durante un período de al menos 4 minutos, durante el cual se estudiaron las siguientes variables dependientes (VDs):

- Frecuencia de descarga (espigas/s).
- Ráfagas por segundo (ráfagas/s).
- Frecuencia de descarga en ráfagas (espigas dentro de ráfaga/s).
- Frecuencia de descarga fuera de ráfagas (espigas simples/s).
- Coeficiente de variación de los intervalos interespiga (CV de IIEs).

1.2.2. SUJETOS EXPERIMENTALES Y PROCEDIMIENTO PARA LAS HEMITRANSECCIONES

En las ratas hemitranseccionadas, la hemitransección se realizaba antes de comenzar los registros electrofisiológicos de las neuronas dopaminérgicas nigrales, mediante la inserción de una cuchilla, en el cerebro, para producir la transección completa del lado derecho (ipsilateral al lado del registro) bien anterior a la sustancia negra o bien posterior.

Para las ratas hemitranseccionadas anteriormente, se fabricó una

cuchilla con 4 mm de longitud cortante , a partir de la cuchilla de un bisturí del n° 22 (Paragon), a la que se soldó, en su vértice superior, una aguja lumbar (22'21-2, 64'0,7; DIAMOND POINT), tal y como se muestra en la Figura 1.1.A., con el fin de sujetar la cuchilla a una de las torres del estereotáxico. La superficie cortante de la cuchilla se situaba perpendicular al eje de simetría de la rata en las coordenadas (una vez colocada la rata en el estereotáxico y trepanado el cráneo): - 2,56 mm con respecto al bregma, el extremo lateral izquierdo a 0,1mm lateral a la línea media y se movía en el eje dorso-ventral unos 10 mm. Por último, se sacaba la cuchilla y se aplicaba una gasa para parar la hemorragia.

Para la hemitransección posterior, se fabricó otra cuchilla en la que se empleó una microhoja (MARTIN, 10-097-00) cuya superficie cortante era de 4,5mm (Fig.1.1.A.) Se siguió el mismo procedimiento que para la hemitransección anterior pero con la excepción de que la cuchilla fue insertada posterior a la sustancia negra (AP= 1,36 anterior a lambda, 0,1 mm lateral a la línea media, V= 10mm aproximadamente).

La comprobación de la hemitransección total, en ambos casos, se hizo con los procedimientos histológicos de rutina (Figura 1.1 B.).

Unos 20-30 minutos después de la intervención quirúrgica se procedía al registro de la actividad de las neuronas dopaminérgicas nigrales. Como control se utilizaron animales que no fueron sometidos a ningún tipo de hemitransección. En total se registraron 128 neuronas nigroestriatales (50 procedentes de 5 ratas intactas, 50 de 5 ratas con hemitransección anterior y 28 de 4 ratas con hemitransección posterior).

Las neuronas fueron consideradas como dopaminérgicas nigroestriatales si cumplían los criterios expuestos en el método general, salvo en el caso de las células del grupo hemitranseccionado anteriormente a las cuales no se les pudo registrar la respuesta antidrómica por lo que, tampoco, se les pudo estimar su velocidad de conducción.

1.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los parámetros de la actividad espontánea fueron obtenidos por ordenador con programas realizados al efecto en lenguaje True-basic y los estudios estadísticos con el paquete SPSS para Window (1992).

Para los análisis estadísticos se emplearon ANOVAs de una vía y la t de Student para comparación de medias. Para el estudio de distribuciones se empleó la prueba de bondad de ajuste χ^2 . Los contrastes se estimaron significativos cuando el error α fue inferior a 0,05.

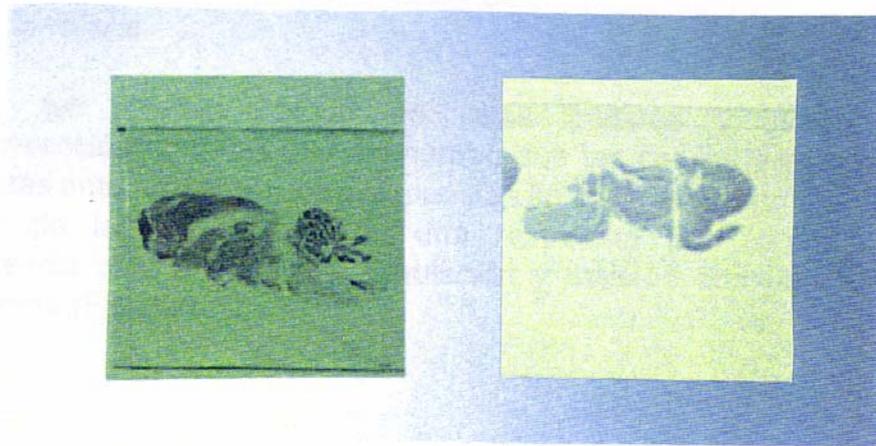
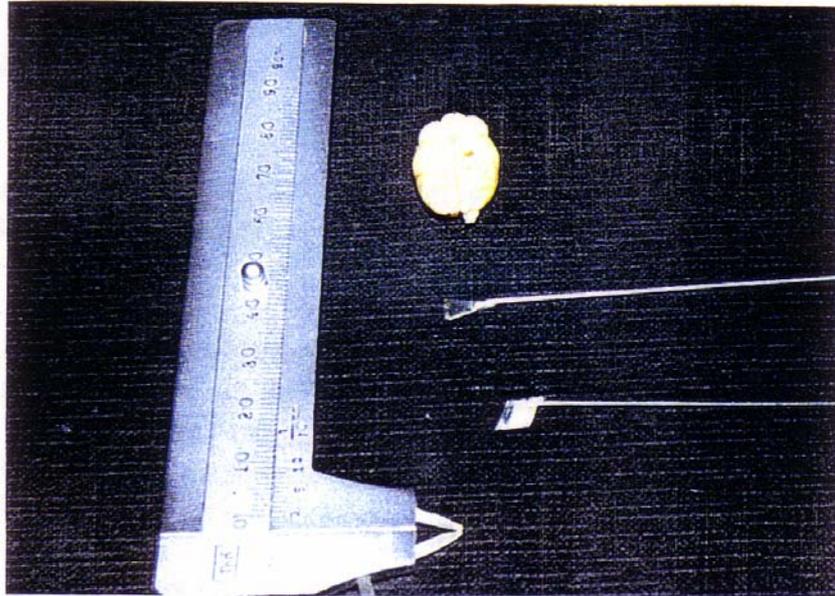


FIGURA 1.1. En A. se muestran las cuchillas empleadas para realizar las hemitransecciones anterior (cuchilla superior) y posterior (cuchilla inferior) a la sustancia negra. En B., se puede observar dos muestras de la comprobación histológica de ambas hemitransecciones anterior (derecha) y posterior (izquierda).

1.3. RESULTADOS

1.3.1 CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS REGISTRADAS

Las células registradas presentaron potenciales de acción bifásicos o trifásicos con la primera fase positiva y duración superior a 2,5 ms. Todas ellas, fueron registradas en la SN compacta o zonas inmediatamente adyacentes, según mostraron las comprobaciones histológicas posteriores.

Algunas de estas neuronas mostraron actividad en ráfagas de acuerdo con lo descrito en otros trabajos (Bunney et al. 1973; Grace y Bunney, 1980; 1983a; 1984b), con disminución de amplitud de los PAs según avanza la ráfaga.

Cuando fue posible (grupo de ratas intactas y grupo con hemitransección posterior), se comprobó que las células presentaban .respuestas antidrómicas. Estas respuestas antidrómicas cumplieron los criterios de latencia constante, una respuesta por estimulación, permanencia con 50 Hz de estimulación y colisión con una espiga espontánea (Figura.1.2).

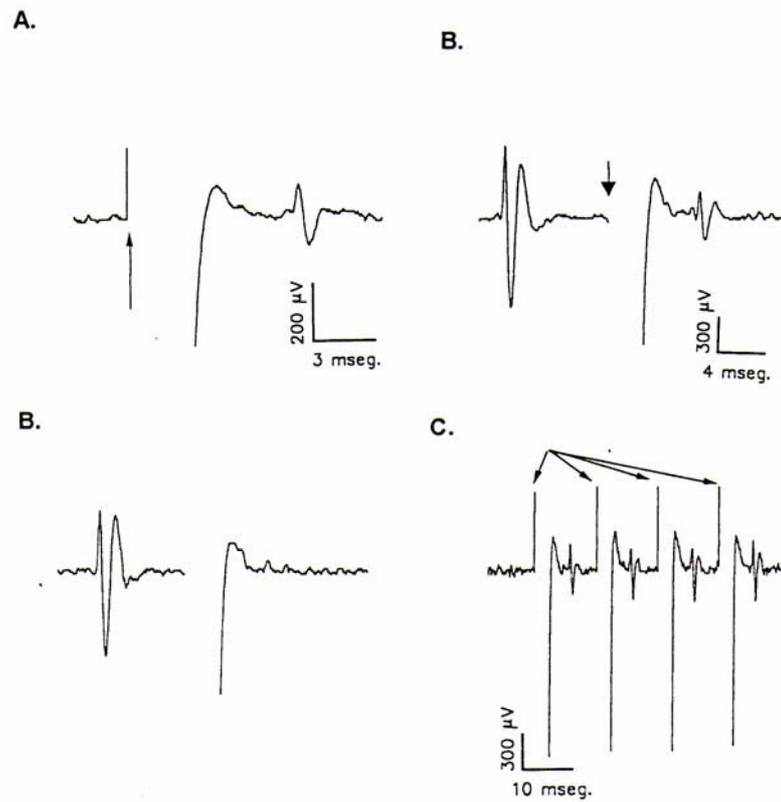


FIGURA 1.2. (A y B) Test de colisión de la respuesta antidrómica. La respuesta puede ser colisionada con un potencial de acción espontáneo cuando la demora de la estimulación (flechas) es lo suficientemente pequeña (menor que la latencia antidrómica)(B). (C) Respuesta antidrómica con alta frecuencia de estimulación (50 Hz). Esta neurona sigue el criterio de una respuesta por estimulación, latencia constante y permanencia con alta frecuencia de estimulación.

La media de las latencias antidrómicas por estimulación estriatal para el grupo sin hemitransección (Controles) fué de $10,61 \pm 1,72$ [rango: 7,5; 14,32] ms y para el grupo con el cerebro hemitranseccionado posteriormente (Ht-Posperior) fue de $11,2979 \pm 2,943$ [rango: 7,84;21] ms. No encontramos diferencias al comparar estas medias [$t;5=-0,713$; $p=0,18$]. Por otra parte, la distribución de las células en cuanto a las latencias antidrómicas (Figura 1.3) del grupo ht-posterior se ajusta a la de el grupo intactas [$\chi^2(7)=13,38$; $p=0,063$].

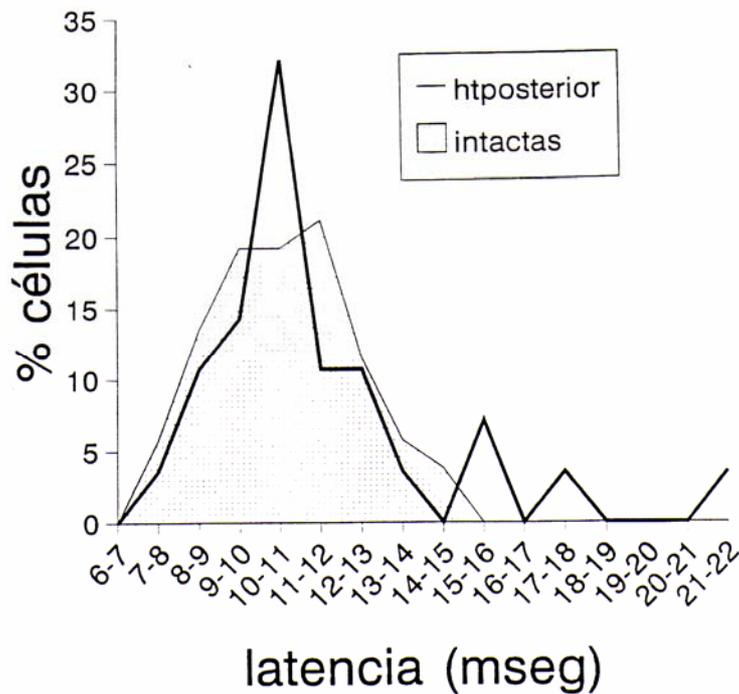


FIGURA 1.3. Histograma de distribución de las células en función de las latencias antidrómicas por estimulación estriatal en ratas sin hemitransección (controles) y con hemitransección posterior a la sustancia negra (Ht-posterior).

A partir de las coordenadas de registro y de la latencia antidrómica de cada célula se estimó su velocidad de conducción (Figura 1.4). La

media de la velocidad de conducción obtenida para el grupo intactas es de 0,58 t 0,11 [rango: 0,38; 0,82] m/s y de 0,598 t 0,125 m/s [rango: 0,28; 0,86] para el grupo ht-posterior. Al compararlas estadísticamente, no encontramos diferencias entre ambas ($t_{6}=0,019$; $p=0,512$). Por otra parte, el grupo ht-posterior presenta una distribución de las velocidades de sus células que se ajusta a la distribución de las velocidades las células del grupo de ratas intactas [$\text{Chi}^2(5)=8,253$; $p=0,143$].

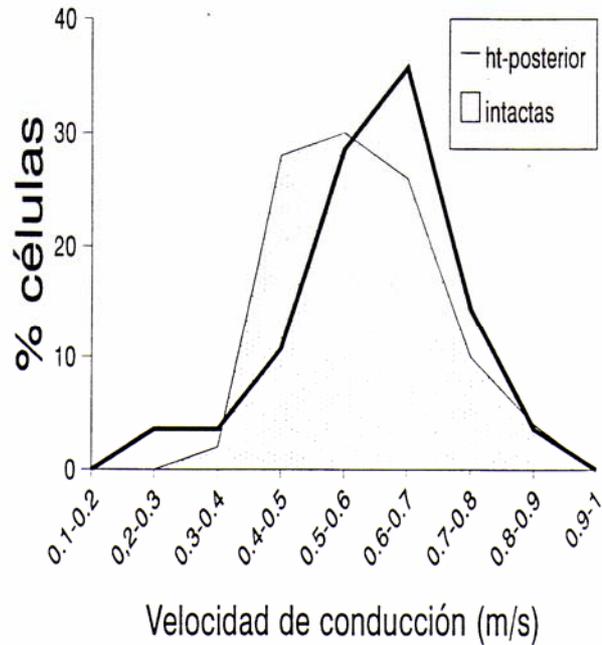


FIGURA 9.4. Histogramas de distribución de las células en función de la velocidad de conducción estimada para el grupo control y para el grupo Ht-posterior.

1.3.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA

Comenzamos el estudio de la actividad espontánea de las células

registradas, analizando su frecuencia de disparo (número de espigas/segundo). Los valores de las medias de las frecuencias de disparo de los tres grupos estudiados pueden observarse en la tabla 1.1.

TABLA 1.1. Media, rango, desviación estándar y error estándar de la frecuencia de descarga de las neuronas de los grupos control, con hemitransección anterior y con hemitransección posterior. EEM= error estándar de la media.

| GRUPO | MEDIA | RANGO | Sx | EEM |
|--------------|-------|-------------|------|------|
| Intactas | 3,68 | [0,74;8,21] | 1,99 | 0,28 |
| Ht-anterior | 3,89 | [0,52;7,64] | 1,93 | 0,27 |
| Ht-posterior | 4,99 | [1,58;9,81] | 1,79 | 0,34 |

El ANOVA de una vía intergrupo para las frecuencias de descarga, resultó significativo [$F_{22,12}=4,15$; $p=0,018$]. Los análisis para la t demostraron que la frecuencia de descarga del grupo con ht-posterior resultó significativamente mayor que en los grupos control y con htanterior ($t_{6}= -1,27$, $p=0,007$; $t_{76}= -1,06$, $p=0,02$, respectivamente). La frecuencia de descarga del grupo con ht-anterior no resultó significativamente distinto de la media obtenida con cerebros intactos ($t_{98}= -0,21$, $p= 0,59$) (Figura 1.5.).

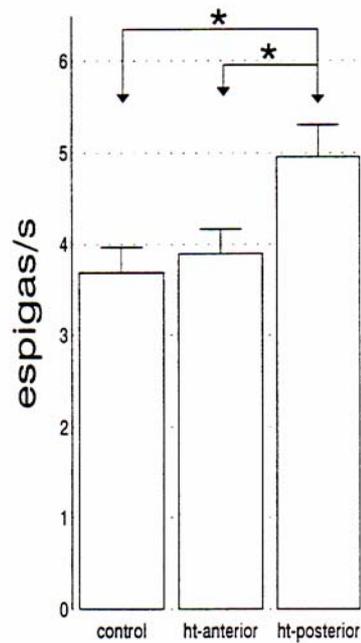


FIGURA 1.5. Media y error estándar de la variable frecuencia de descarga para los tres grupos estudiados. Encontramos una frecuencia de descarga mayor en el grupo Ht-posterior con respecto al los grupos Control y Ht-anterior ($p < 0, 05$).

De forma consistente con el análisis de las medias encontramos que la distribución en función de la frecuencia de descarga de las células del grupo de ht-posterior no se ajustó a aquella obtenida en las células de las ratas intactas [$\chi^2(8)=27,625$ $p=0,001$]. Sin embargo, el mismo contraste para el grupo de ht-anterior no resultó significativo [$\chi^2(8)=9,89$; $p=0,273$] (Figura 1.6).

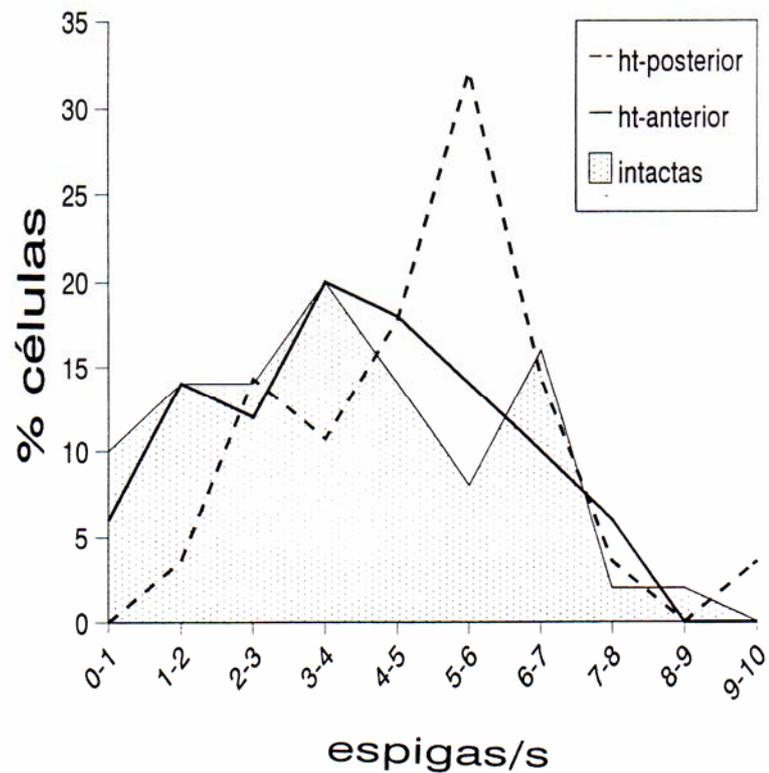


FIGURA 1.6. Distribución de las neuronas en función de su frecuencia de descarga. La distribución de las células del grupo Ht-posterior no se ajustó a la distribución de neuronas de ratas intactas ($\chi^2(8)=27,625$; $p=0,001$). Mientras que, el mismo contraste para las Ht-anterior no resultó significativo ($\chi^2(8)=9,889$; $p=0,273$).

Las características del modelo de descarga fueron estudiadas en función de los modelos descritos; analizamos los tres modos fundamentales en que pueden descargar las células dopaminérgicas; en forma de espiga simple regularmente o irregularmente (frecuencia fuera de ráfagas, coeficiente de variación) y en forma de ráfagas (número de ráfagas/segundo, frecuencia dentro de ráfagas).

En la tabla 1.2 se encuentran recogidos los resultados de la aplicación del ANOVA, para estas variables dependientes. A continuación, en la tabla 1.3, se recogen las medias de los distintos grupos en estas variables.

TABLA 1.2. *F y probabilidad resultantes de los ANOVAs realizados para las variables del modelo de descarga: frecuencia de descarga en forma de espiga simple (Hz fuera de ráfagas), frecuencia de descarga en forma de ráfagas (Ráfagas/s), frecuencia de descarga dentro de ráfagas (Hz dentro de ráfagas) y coeficiente de variación (CV) de los tres grupos estudiados.*

| | $F_{2,124}$ | p |
|----------------------|-------------|---------|
| Hz fuera de ráfagas | 3,157 | 0,046 * |
| Ráfagas/s | 0,238 | 0,788 |
| Hz dentro de ráfagas | 0,844 | 0,432 |
| CV | 4,586 | 0,012 * |

TABLA 1.3. Media, rango, desviación estándar y error estándar de la media (EEM) de las ráfagas segundo (ráfagas), de los potenciales de acción dentro de ráfaga/s (dentro), de los potenciales de acción fuera de ráfagas/s (fuera) y del coeficiente de variación (CV) de las neuronas de los grupos control, con hemitransección anterior y con hemitransección posterior.

| RÁFAGAS | MEDIA | Sx | EEM |
|----------------|--------------|-----------|------------|
| Intactas | 0,132 | 0,272 | 0,038 |
| Ht-anterior | 0,139 | 0,225 | 0,032 |
| Ht-posterior | 0,175 | 0,282 | 0,051 |
| DENTRO | | | |
| Intactas | 0,429 | 0,993 | 0,141 |
| Ht-anterior | 0,522 | 1,033 | 0,147 |
| Ht-posterior | 0,780 | 1,768 | 0,346 |
| FUERA | | | |
| Intactas | 3,254 | 1,558 | 0,222 |
| Ht-anterior | 3,798 | 1,667 | 0,238 |
| Ht-posterior | 4,176 | 1,487 | 0,286 |
| CV | | | |
| Intactas | 0,395 | 0,168 | 0,024 |
| Ht-anterior | 0,327 | 0,163 | 0,023 |
| Ht-posterior | 0,441 | 0,151 | 0,029 |

Los ANOVAS mostraron que las frecuencias de descarga en ráfagas y dentro de ráfagas no se vieron estadísticamente afectadas por las condiciones experimentales (figura 1.8.). Sin embargo, si se obtuvo un efecto significativo en las variables frecuencia fuera de ráfagas y coeficiente de variación por lo que realizamos los contrastes de medias para estas variables. Encontramos que, como se muestra en la Figura 1.7., la media de la frecuencia de descarga fuera de ráfagas del grupo Ht-posterior fue superior a la del grupo control, no alcanzando la significación el resto de los contrastes.

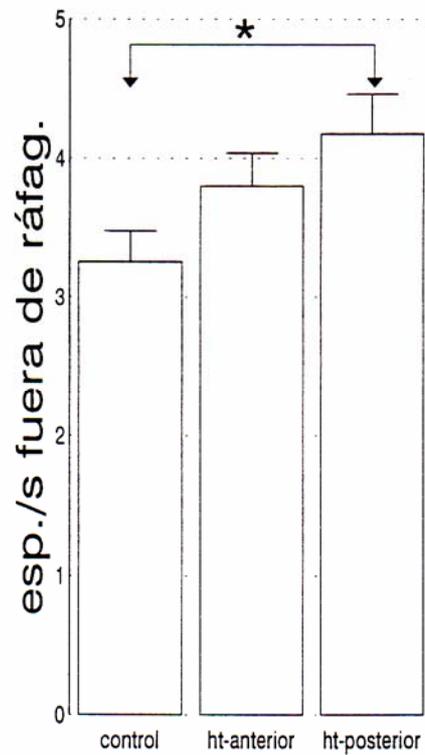


FIGURA 1.7. Media y error de la variable frecuencia de descarga fuera de ráfagas de los tres grupos estudiados. Observamos que dicha frecuencia es mayor que la

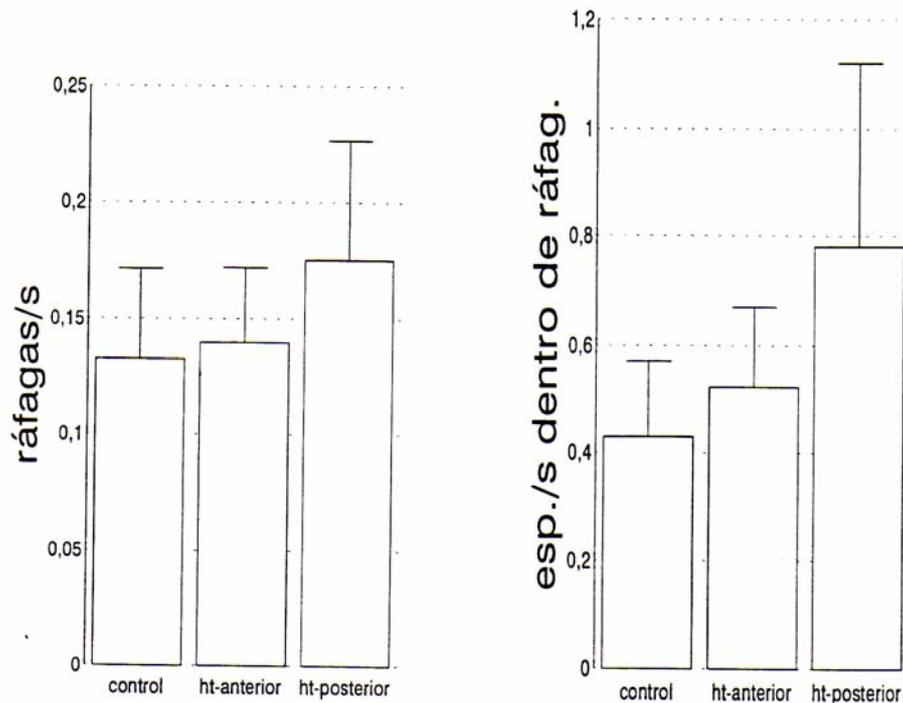


FIGURA 1.8. Media y error de las variables frecuencia de descarga en ráfagas (A) y frecuencia de descarga dentro de ráfagas (B). No encontramos diferencias significativas entre los tres grupos para ninguna de estas variables.

Por último, encontramos que la ht-anterior provocó un aumento de la regularidad con respecto al grupo control ($t_{98}=0,717$; $p=0,035$) y este aumento fue mayor con respecto al grupo con ht-posterior ($t_{76}=-0,1135$; $p=0,004$). El grupo con Ht-posterior no se diferenció del grupo control ($t_{76}=-0,0418$; $p=0,287$) (figura 1.9).

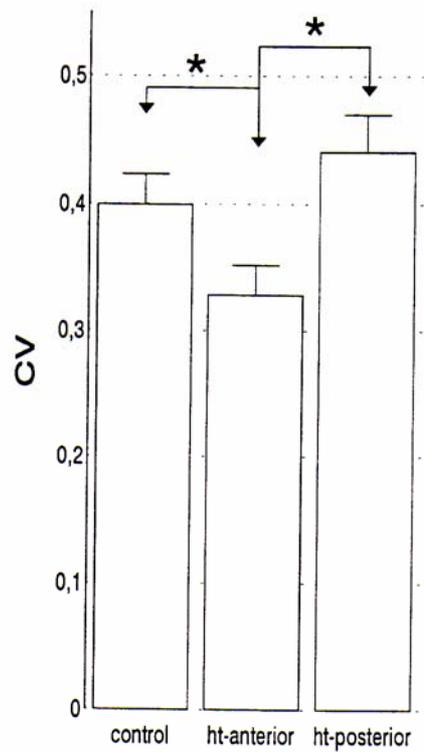


FIGURA 1-9. Media y error de la variable coeficiente de variación (CV) de los tres grupos celulares. Encontramos que, disminuye en el grupo Ht-anterior con respecto al grupo control ($t_{,6}=-0,717$; $p=0,035$) y aún más con respecto al grupo con ht-posterior ($t_{,6}=-0,1135$; $p=0,004$). El grupo con Htposterior no se diferenció del grupo control ($t_{,6}=-0,0418$; control ht-anterior ht-posterior $p=0,287$).

1.4. DISCUSIÓN

La actividad de las células dopaminérgicas en preparaciones dónde la sustancia negra se encuentra desaferentizada es diferente de la actividad registrada en animales anestesiados, paralizados o en libre movimiento, en los que la sustancia negra conserva todas sus aferencias. La diferencia radica fundamentalmente en su modelo de descarga si bien pueden existir diferencias en la frecuencia. Las neuronas de preparaciones de rodajas cerebrales presentan un modelo de descarga muy regular y sin ráfagas conocido como descarga en "marcapasos" (Kita, Kita y Kitai, 1966; Brodie y Dunwiddie, 1987; Grace, 1987; Shepard y Bunney, 1988). Sin embargo, en preparaciones in vivo, las células dopaminérgicas de la sustancia negra descargan de forma irregular y tanto en forma de espigas simples como en ráfagas. Es más, en animales en libre deambulación la descarga en ráfagas es mayor que en animales anestesiados o paralizados (Freeman y col., 1985) y se ha descrito que descargan en forma de ráfagas cuando los animales están realizando tareas locomotoras o cuando se presentan estímulos asociados a reforzamiento (Diana y col., 1989; Romo y Schultz, 1990; Schultz y Romo, 1990).

Todo esto hace pensar que tanto la irregularidad como la descarga en ráfagas son dos características de la actividad electrofisiológica de las células dopaminérgicas que están directamente relacionadas con la acción de las aferencias sobre la SN.

Así pues, la actividad de las neuronas dopaminérgicas es el resultado de la combinación de las propiedades intrínsecas de su membrana (actividad endógena de la propia célula) y de la modulación de su conductancia por la actividad procedente de las aferencias. Los estudios intracelulares in vivo muestran que el patrón de descarga de las células DA nigroestriales está sustentado en la alternancia de dos corrientes: una despolarización lenta que ocurre espontáneamente y lleva a la membrana desde su potencial en reposo al valor umbral, y una posthiperpolarización

mediada por una conductancia de potasio (Grace y Bunney, 1984). La despolarización lenta dispara espigas en las neuronas dopaminérgicas y tiene una serie de características en común con los potenciales en marcapasos (Grace y Bunney, 1984).

En base a la información disponible, el modelo actual de regulación de las células A9 se fundamenta en la regulación por liberación dendrítica de DA (Aghajanian y Bunney, 197 ; Groves y col; 1975), por la interacción con otras células nigrales (Grace y Bunney, 1985) por aferencias ipsilaterales, en especial la vía estriatonigral (Dray, 1979) y por aferencias contralaterales (Castellano y col., 1991).

En el presente experimento quisimos comparar el efecto de la desconexión de las aferencias anteriores y el de las aferencias posteriores sobre la actividad electrofisiológica de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales.

Todas las neuronas registradas cumplen los criterios para ser consideradas neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. En el caso de las ratas hemitranseccionadas anteriormente a la sustancia negra, como es lógico, no se pudo realizar la prueba de activación antidrómica desde el esfriado. No obstante, dado que este grupo no se diferenció del grupo control en la mayor parte de los parámetros estudiados con la excepción del coeficiente de variación, el hecho de las marcadas diferencias que presentan las neuronas DA con las neuronas no dopaminérgicas de la nigra y zonas adyacentes (Bunney y col, 1973; Guyenet y Crane, 1981; Deniau y col, 1978; Grace y Bunney, 1980, 1983a) y las coordenadas utilizadas (Bunney y col., 1973) nos hacen concluir la naturaleza dopaminérgica de este grupo celular.

La frecuencia de descarga (número de espigas/segundo) de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales de las ratas hemitranseccionadas posteriormente, se modificó significativamente tanto con respecto al grupo control (sin hemitransección) como con respecto al grupo con hemitransección anterior a la sustancia negra. Este aumento en la frecuencia de descarga parece que es debida fundamentalmente a un aumento del número de descarga en forma de espigas simples ya que,

aunque la descarga en ráfagas aumentó, no se diferenció estadísticamente del grupo control ni del grupo con hemitransección anterior, tampoco se modificó el número de espigas dentro de ráfagas y se observaron diferencias significativas en la frecuencia de descarga fuera de ráfagas.

La hemitransección anterior aumenta la regularidad de la descarga de las neuronas dopaminérgicas nigrales sin afectar su frecuencia.

Esto nos lleva a pensar que el efecto de las aferencias anteriores sobre las neuronas NSDA es diferente al efecto de las aferencias posteriores. Las primeras parecen estar más relacionadas con la regularidad de los intervalos interespigas mientras que las aferencias posteriores parecen estar más involucradas en la frecuencia de descarga.

Ante estos resultados, no podemos olvidar el hecho de que los registros electrofisiológicos se han realizado en animales anestesiados y sabemos que hay algunas diferencias en las características electrofisiológicas de las neuronas NSDA cuando el animal se encuentra bajo el efecto de la anestesia con respecto a registros en animales paralizados o en libre deambulación (Bunney y col, 1973; Mereu y col en 1983, 1984; Freeman y Bunney, 1987; Schultz y Romo, 1987; Kelland y col., 1989;).

Por otra parte, el hecho de que las modificaciones aquí encontradas no sean de gran magnitud desde el punto de vista bioeléctrico, si es posible que tengan un efecto multiplicador sobre la neurotransmisión. Así, se ha observado que la liberación de dopamina en el estriado inducida por estimulación eléctrica del MFB se incrementa de manera exponencial al aumentar la frecuencia de estimulación. Además, si se estimula el MFB a la misma frecuencia pero a intervalos iguales o agrupando las estimulaciones en ráfagas ocurre que la liberación de dopamina es dos veces mayor (Gonon y Buda, 1985; Gonon y col., 1991). En definitiva, pequeños cambios, tanto en la frecuencia de descarga, como en el modelo de descarga se pueden traducir en grandes diferencias en cuanto a la cantidad de dopamina liberada en el estriado.

No tenemos conocimiento de estudios similares con respecto a la ht

posterior. En cuanto a la hemitransección anterior sí hay algunos estudios con resultados similares en cuanto a la disminución del coeficiente de variación que, en ocasiones, alcanzan la significación pero no siempre (Zhang y col., 1992; Smith y Grace, 1992). Algunos investigadores indican una modificación en la frecuencia de descarga tras la hemitransección anterior en algunas neuronas si su descarga es moderada (Zhang y col., 1992) o según su localización (Smith y Grace, 1992).

La idea actual de la regulación de la actividad de las NSDA por aferencias procedentes de otros núcleos es que, fundamentalmente, se debe a las del cerebro anterior, especialmente a las del estriado (Dray, 1979; Bunney y Aghajanian, 1976; Grace y Bunney, 1979; Waszczak y col., 1980; Eng y Walters, 1980; Vicent y col., 1982; PalKovits y col., 1984; Zamir y col., 1984; Grace y Bunney, 1985; Ryan y col., 1986; Reid y col., 1988, 1990 a b,c; Christensson- Nylander, 1986; Collingridge y Davies, 1980; 1981) y también las procedentes de la corteza prefrontal (Gariano y Groves, 1988) y del subtálamo (Smith y Grace, 1992). Pero nuestros datos sugieren que las aferencias posteriores también son relevantes para entender la actividad electrofisiológica de las neuronas dopaminérgicas nigrales. De hecho, sabemos que la actividad de las A9 está regulada por una gran variedad de estímulos sensoriales periféricos (Grace y col., 1980; Chiodo y col., 1980; Hommer y Bunney, 1980; Kelland y col., 1989; Mantz y col., 1989). Como la destrucción de los sistemas de vías aferentes desde el cerebro anterior no eliminan estas respuestas (Grace y col., 1980; Kelland y col., 1989) existe la posibilidad de que las llegadas de estos estímulos a la nigra se realice a través de los sistemas aferentes ascendentes.

La importancia de las aferencias posteriores sobre la actividad de las células NSDA, los escasos conocimientos actuales sobre dichas aferencias en comparación con los relativos a las aferencias anteriores así como los resultados obtenidos en este experimento, nos ha llevado a plantear el estudio de la regulación de la actividad de las NSDA por parte de las aferencias posteriores a la sustancia negra y hemos centrado nuestra atención en la acción del núcleo tegmental pedúnculo-pontino, por la posibilidad adicional de que este núcleo esté implicado en la

regulación contralateral de la actividad electrofisiológica de las neuronas NSDA.

2. EXPERIMENTO 2

Respuestas de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales a la estimulación eléctrica del núcleo pedúnculo-pontino ipsilateral.

2.1 OBJETIVOS

Los resultados obtenidos en nuestro primer experimento en relación a la importancia de las aferencias posteriores sobre la actividad electrofisiológica de las células NSDA y los escasos conocimientos actuales de dichas aferencias comparados con las aferencias anteriores nos ha llevado a plantear el estudio de la influencia sobre la actividad de las NSDA por parte de las aferencias posteriores a la sustancia negra. En la presente Tesis doctoral centraremos nuestro estudio en la influencia de la estimulación eléctrica del PPN sobre la actividad de las células NSDA, una de las estructuras más densamente inervada por el PPN (Jackson y Crossman, 1983; Saper y Loewy, 1982; Parent y De Bellefeuille, 1983; Scarnati y col., 1986, 1987a, 1987b).

Estudios previos han centrado su investigación sobre una respuesta excitatoria de latencia corta (2-3 ms) encontrada en las NSDA tras la estimulación del PPN (Scarnati y col., 1986, 1987a, 1987b). Esta respuesta ha sido asociada a vías glutamérgicas PPN-SNc. Sin embargo, se sabe que existen también otras vías colinérgicas y, probablemente, de otros neurotransmisores (Sugimoto, y Hattori, 1984; Scarnati y col., 1986, 1987b; Di Loreto y col. 1992; Lee y col. 1988). Por otra parte, el PPN inerva también a la SNr (Graybiel, 1977; Saper y Loewy, 1982; Gerfen y col., 1982; Moon Edley y Grabyel, 1983) y a otras áreas cerebrales como el subtálamo o el núcleo entopeduncular (Jackson y Crossman, 1983; Woolf y Butcher, 1985; Canteras y col., 1990) con influencia sobre la actividad de las NSDA. Esto nos lleva a pensar que la influencia del PPN sobre la actividad de las NSDA es probablemente

mucho más compleja que lo que han mostrado diferentes estudios realizados hasta ahora. En este experimento, pretendemos:

1) Estudiar y evaluar otras posibles respuestas de las NSDA tras la estimulación del PPN sobre la actividad de las NSDA. Para ello hemos utilizado como anestésico el hidrato de cloral que sabemos bloquea, al menos, la respuesta excitatoria corta (Kelland y col, 1990) descrita hasta ahora y nos asegura que las posibles respuestas que encontremos no serán rebotes de la misma.

2) En caso de encontrar algún tipo de respuesta, estudiar si modifica la actividad basal de las neuronas NSDA y si hay algún tipo de relación entre la actividad basal y las respuestas obtenidas.

2.2. MATERIAL Y MÉTODO

2.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental elegido para la realización de este segundo experimento estaba constituido por una variable intragrupo (estimulación eléctrica del PPN ipsilateral) con dos niveles: antes y durante la estimulación.

Las variables dependientes fueron:

1. Variables dependientes de los HTPEs:

- Número de respuestas por célula.
- Latencia de inicio y duración de cada respuesta.
- Número de potenciales de acción modificados en los periodos

con respuesta por células (POTENCIA ABSOLUTA), dónde se puede distinguir:

* Número de potenciales inducidos por estimulación en los periodos de excitación.

* Número de potenciales de acción suprimidos por estimulación en los periodos de inhibición.

* Porcentaje de potenciales de acción inducidos o suprimidos en relación a los esperados antes de la estimulación (POTENCIA RELATIVA).

2) Variables dependientes de frecuencia y modelo de descarga descritas para el experimento 1.

La estimulación consistió en un pulso cuadrado de corriente de 300 mA de intensidad, 0,3 ms de duración a 1 Hz de frecuencia. Las características del electrodo de estimulación son las descritas en el método general.

2.2.2. SUJETOS EXPERIMENTALES

Se registraron 46 células dopaminérgicas nigroestriales en 8 ratas machos Sprague Dawley anestesiadas con hidrato de Cloral. Las coordenadas de estimulación del PPN fueron: 1,8 mm lateral a la línea media, 7,8 mm posterior a bregma y 7,3 mm ventral a la duramadre (Paxinos y Watson, 1986).

Las células fueron consideradas como dopaminérgicas nigroestriales si cumplían los criterios expuestos en el método general. Además, las células utilizadas en este estudio pertenecen a ratas en las que se

comprobó histológicamente que el electrodo de estimulación estuvo bien situado.

2.2.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los registros constaban de dos fases, una primera fase de 4 minutos en la que se registraba la actividad espontánea estable de la neurona y un segundo periodo de 7 minutos aproximadamente (dependiendo de la frecuencia de descarga de la neurona hasta completar un mínimo de 1500 PA en el periodo de estimulación) en el que se registraba la actividad basal al tiempo que se estimulaba el PPN.

2.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los análisis estadísticos se emplearon ANOVAs de medidas repetidas de una vía con un factor de medidas repetidas (antes-durante la estimulación) y el test de T de Student para el contraste de medias. Para el estudio de distribuciones en alguna de las variables se empleó la prueba de bondad de ajuste χ^2 . Los contrastes se estimaron significativos cuando el error α fue inferior a 0,05. También se utilizaron diferencias de medias para muestras relacionadas y coeficientes de correlación de Pearson.

2.3. RESULTADOS

2.3.1 HISTOGRAMAS PERIESTÍMULO

Las células registradas presentaron potenciales de acción bifásicos o trifásicos con la primera fase positiva y duración superior a 2,5 ms. Todas ellas, fueron registradas en la SN compacta o zonas inmediatamente adyacentes, según mostraron las comprobaciones histológicas posteriores. Algunas de estas neuronas mostraron actividad en ráfagas de acuerdo con lo descrito en otros trabajos (Bunney y col., 1973; Grace y Bunney, 1980; 1983a; 1984b), con disminución de amplitud de los PAs según avanza la ráfaga.

Se comprobó que las células presentaban respuestas antidrómicas. Estas respuestas antidrómicas cumplieron los criterios de latencia constante, una respuesta por estimulación, permanencia con 50 Hz de estimulación y colisión con una espiga espontánea. La media de las latencias antidrómicas por estimulación estriatal fue de 10,01 t 0,29 [rango: 7,44-16,88] ms.

A partir de las coordenadas de registro y de la latencia antidrómica de cada célula, se estimó su velocidad de conducción) La media de la velocidad de conducción obtenida fue de 0,67 t 0,02 [rango: 0,36 - 0,99 m/s].

Los electrodos de estimulación de la región del PPN, según mostraron las comprobaciones histológicas, estaban en la zona (figura 2.1). En la figura 2.2 se muestran cuatro ejemplos de los histogramas de tiempos periestímulos obtenidos tras la estimulación del PPN. Se presenta un histograma de una célula con una repuesta inhibitoria (A) con una respuesta excitatoriados (B) con dos respuestas inhibitorias (C) y con una secuencia de cuatro respuestas mixtas (D).

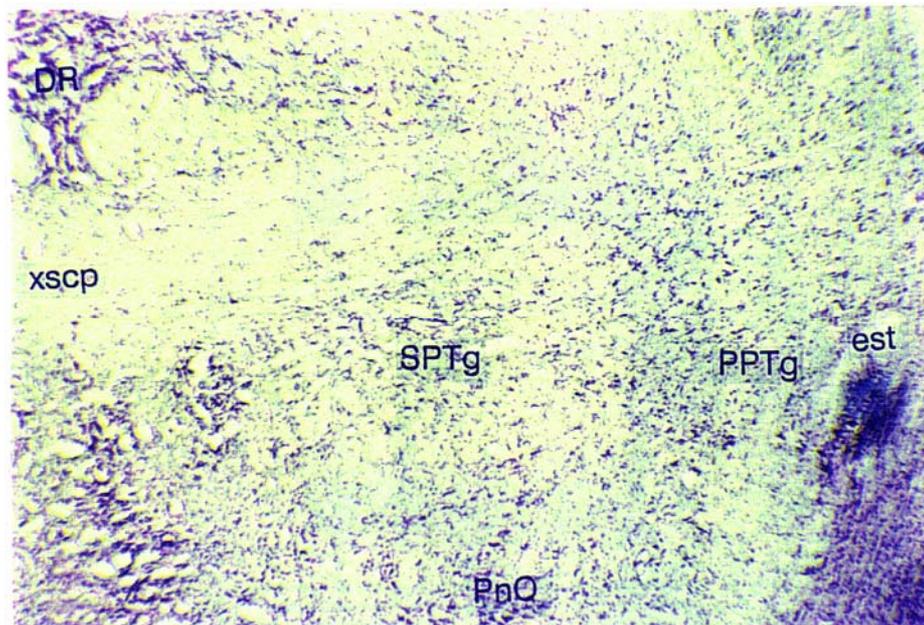


FIGURA 2.1. Comprobación histológica de la situación del electrodo de estimulación del PPN tomando como referencia el atlas de Paxinos y Watson (1986). DR= rafe dorsal, xscp= decusación del pedúnculo cerebelar superior, ~ PnO= núcleo reticular pontino oral, SPTg= núcleo tegmental subpeduncularpontino, PPTg=núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPN); est= marca del electrodo de estimulación.

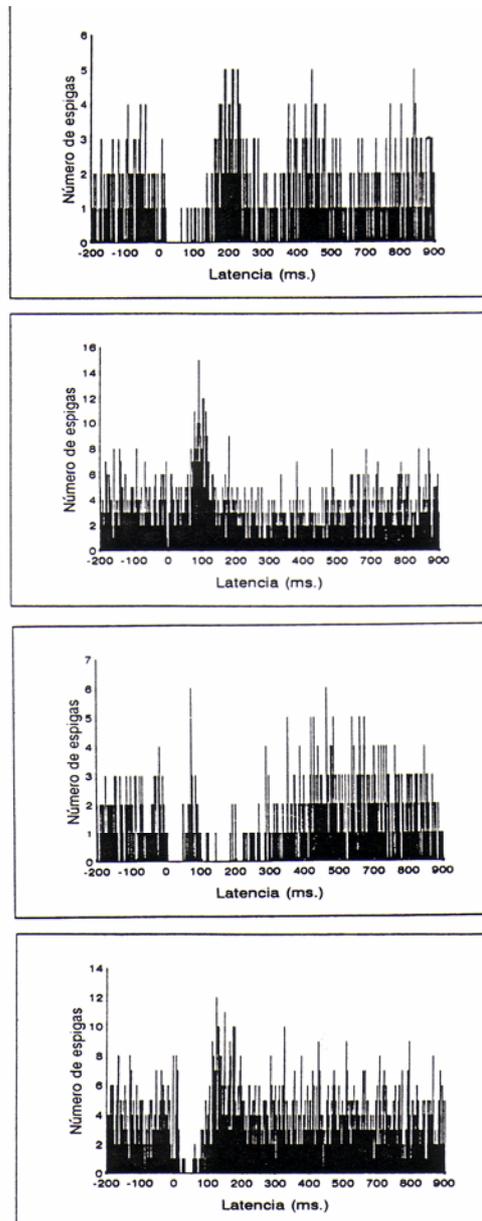


FIGURA 2.2. HTPEs de cuatro células catalogadas como dopaminérgicas nigroestriatales. Estos histogramas se obtuvieron al sumarlos PAs registrados en cada ms desde 200 ms. antes de cada estimulación del PPN ipsilateral hasta 800 ms. transcurridos después de la aplicación de los mismos.

De las 46 células registradas, el 84,78 % mostró alguna respuesta y el 47,83 % mostró más de una respuesta a la estimulación del PPN ipsilateral. En las células que respondieron, la primera respuesta fue una excitación en el 43,59 % de éstas y una inhibición en el 56,41 %. Cuando se encontraron células con más de una respuesta la segunda respuesta fue una excitación en el 61,9 % de los casos y una inhibición en el 38,09 % de los casos (figura 2.3).

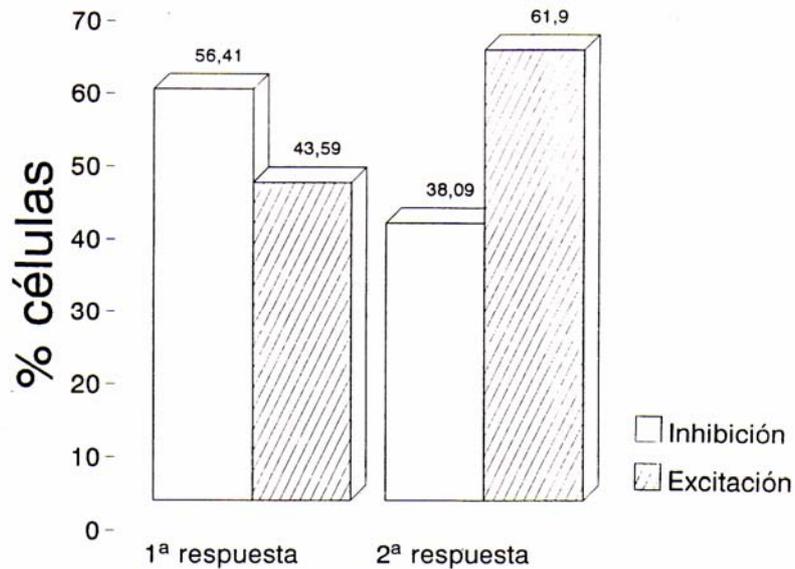


FIGURA 2.3. Porcentaje de células que presentaron una inhibición y porcentaje de las que presentaron una excitación, por primera respuesta, del total de células con respuesta y, de las células con más de una respuesta, porcentaje de células que presentaron una inhibición y las que presentaron una excitación como segunda respuesta, tras la estimulación del PPN ipsilateral.

El porcentaje de células excitadas o inhibidas en los distintos períodos de 1 ms tras la estimulación del PPN se muestra en la figura 2.4. Como se observa, la mayor parte de los períodos excitatorios e inhibitorios se produjeron antes de los 200 ms postestimulación. Un alto porcentaje de células estaban inhibidas durante los primeros 100 ms no encontrándose ningún tipo de respuesta después de los 500 ms. Entre los 17 y 59 ms el porcentaje de células inhibidas fue mayor que el de células excitadas ($p < 0,05$ de la χ^2 excitación vs. inhibición).

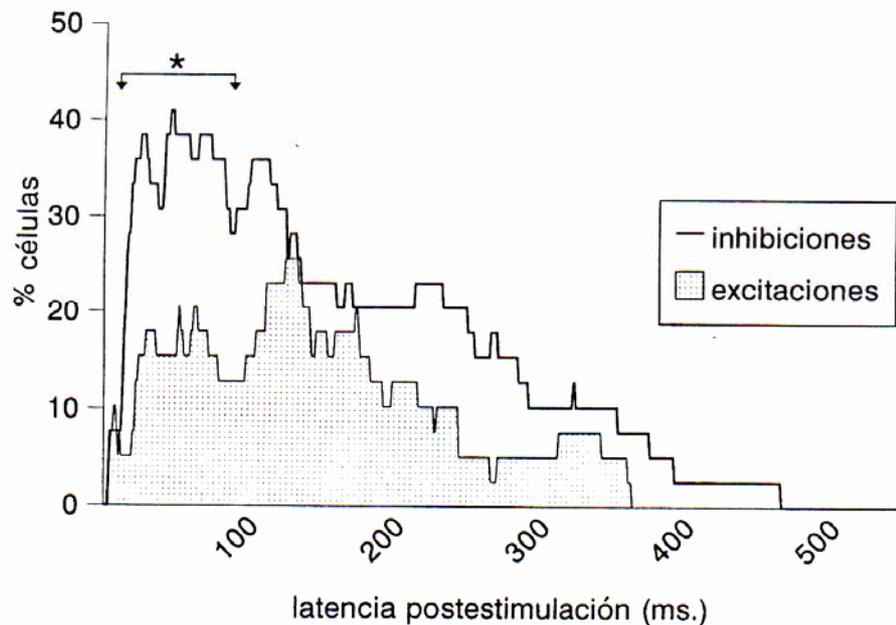


FIGURA 2.4. Porcentaje de células A9 que se encontraban excitadas o inhibidas en los distintos períodos de 1 ms posteriores a la estimulación del PPN ipsilateral (*= $p < 0,05$ tras la χ^2 = excitación vs. inhibición).

El 47,5 % de las respuestas tuvieron una latencia postestímulo menor de 20 ms y el 17,5 % de las respuestas tuvieron una latencia inferior a 10 ms. En la figura 2.5 se muestra el porcentaje de respuestas obtenidas en función de su latencia postestimulación agrupadas en periodos de 10 ms. Se observa cómo la mayoría de las respuestas inhibitorias se inician en periodos anteriores a los 50 ms. con un pico inhibitorio entre los 20-30 ms. Las respuestas excitatorias se distribuyen de una forma más homogénea a lo largo de los 255 ms postestimulación.

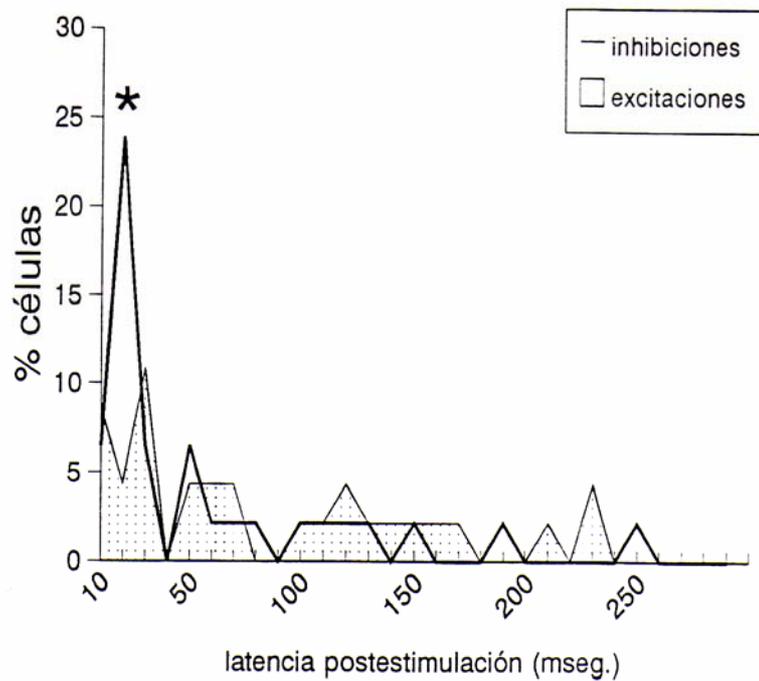


FIGURA 2.5. Histograma de las latencias (intervalos de 10 ms) de las distintas respuestas de las células A9 a la estimulación del PPN ipsilateral.

En cuanto a la duración de esta respuesta, la figura 2.6 muestra cómo, tanto en la primera como en la segunda respuesta las inhibiciones (media primera respuesta = 104,63 t 13,23 ms. media a segunda respuesta = 113,87 t 24,71ms) son más duraderas que las excitaciones (media primera respuesta = 37,3 t 7,12 ms media segunda respuesta = 71,31 t 3,71ms).

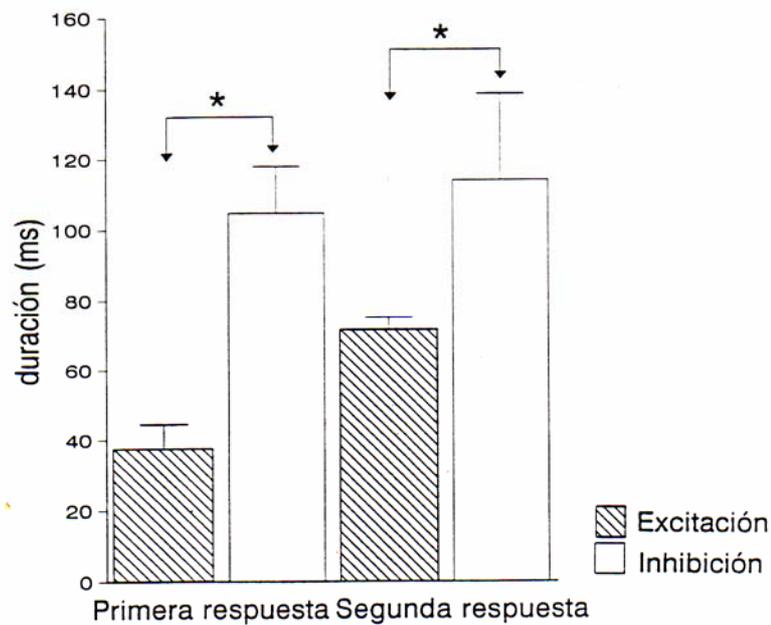


FIGURA 2.6. Media y error estándar de la duración de las distintas respuestas de las células A9 a la estimulación del PPN ipsilateral.

A pesar de las diferencias obtenidas hasta ahora entre las inhibiciones y las excitaciones, al comparar la potencia absoluta (número de

potenciales de acción inducidos o suprimidos por estímulo) durante la primera respuesta, encontramos que fue similar para las inhibiciones y para las excitaciones, sin embargo, en la segunda respuesta fue mayor para las respuestas excitatorias que para las inhibitorias (Fig. 2.7).

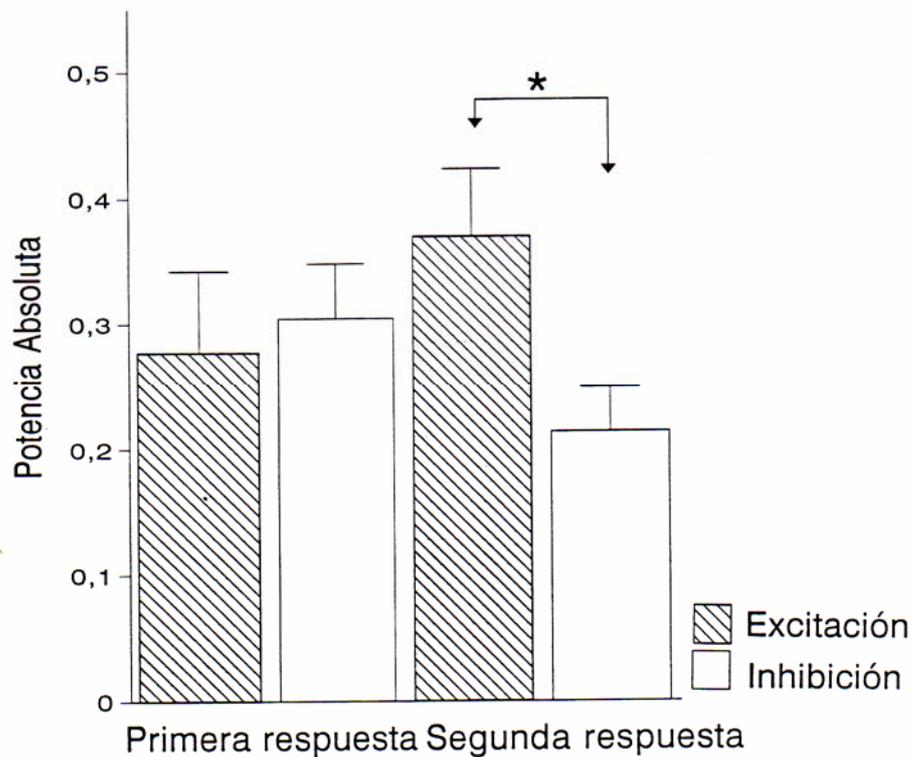


FIGURA 2.7. Media y error estándar de la potencia absoluta en la primera y segunda respuestas excitatorias e inhibitorias tras la estimulación del PPN ipsilateral (*= $p < 0,05$).

Al comparar las potencias relativas (porcentaje de modificación de potenciales de acción en relación a los potenciales de acción

esperados sin estimulación), encontramos que las excitaciones son mucho más intensas en la primera que en la segunda respuesta pero las inhibiciones son similares durante ambas respuestas (Fig.2.7.2)

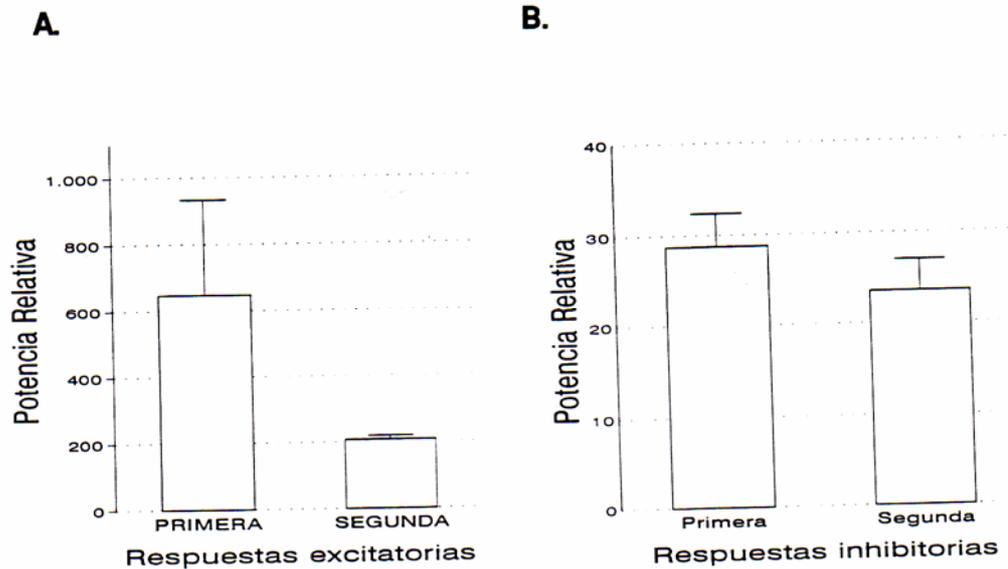


FIGURA 2.7.2. Media y error estándar de la potencia relativa en la primera y segunda respuestas excitatorias e inhibitorias tras la estimulación del PPN.

2.3.2.- ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LAS NSDA Y RESPUESTAS A LA ESTIMULACION DEL PPN

La estimulación eléctrica del PPN a 1 Hz, no fue capaz de modificar ni la frecuencia ni el modelo de descarga de las NSDA (como se muestra en la tabla 2.1 y en la figura 2.8).

TABLA 2.1. Diferencia de medias para las diferentes VDs de la actividad antes y durante la estimulación ipsilateral del PPN. No encontramos diferencias entre ambas fases.

| | t(21) | p |
|-----------------------------|-------|-------|
| espigas/s | -0,50 | 0,621 |
| ráfagas/s | 0,49 | 0,630 |
| espigas/s dentro de ráfagas | 1,02 | 0,320 |
| espigas/s fuera de ráfagas | -1,42 | 0,170 |
| Coefficiente de variación | 1,56 | 0,133 |

s

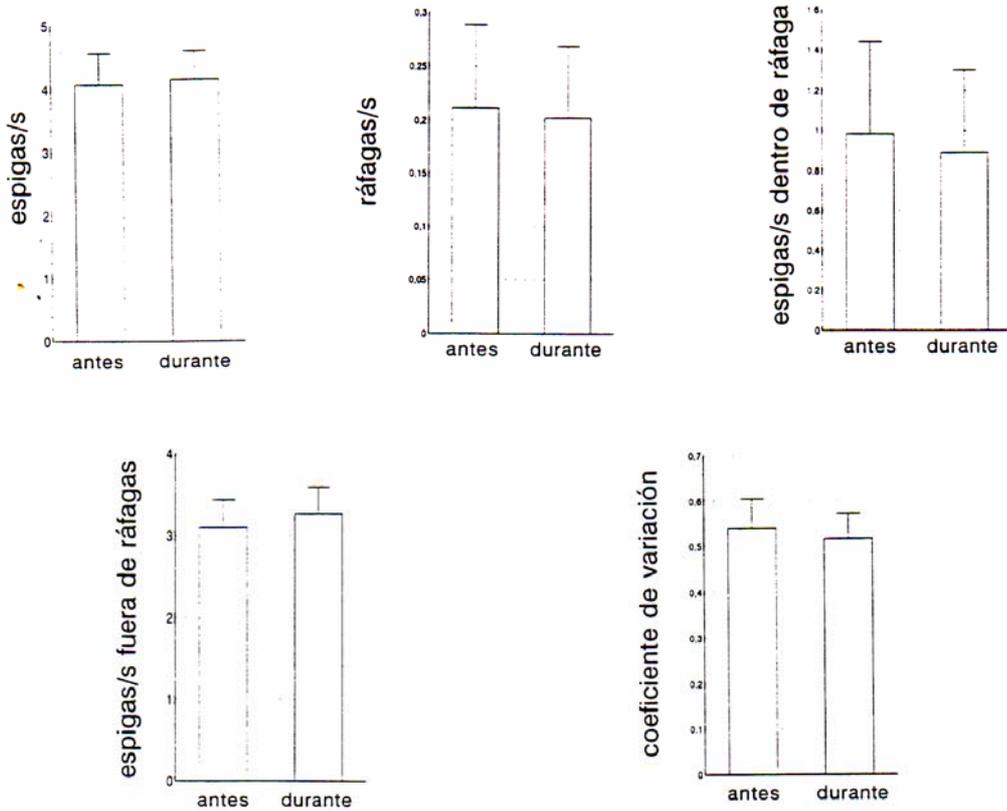


FIGURA 2.8. Media \pm error de las distintas VDs. de la actividad basal, antes y durante la estimulación del PPN ipsilateral.

Sin embargo, al relacionar la actividad basal con la repuesta obtenida en el periestímulo, encontramos índices de correlación significativos entre el número de potenciales de acción modificados y algunos de los parámetros de la actividad basal. No detectamos relación lineal significativa con espigas /s fuera de ráfagas y con el coeficiente de variación (tabla 2.2).

Al estudiar esta correlación separando potenciales de acción inducidos (respuesta excitatoria) de potenciales de acción suprimidos (repuesta inhibitoria) por estimulación aplicada, encontramos que esta correlación desaparece (a excepción de una pequeña correlación positiva con las ráfagas), con respecto a las respuestas inhibitorias, pero aumenta notablemente para las excitatorias Tabla 2.2, Fig 2.9.

TABLA 2.2. Coeficientes de correlación de Pearson del grupo estimulado ipsilateralmente a la sustancia negra (n = 46) (espigas/s = PA/s; ráfagas/s = Ráfagas; espigas/s dentro de ráfagas = Dentro; espigas/s fuera de ráfagas = Fuera; coeficiente de variación = CV).

| | PA MODIFICADOS / ESTÍMULO | PA SUPRIMIDOS / ESTÍMULO | PA INDUCIDOS / ESTÍMULO |
|---------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| PA/s | 0,45 p = 0,001 | 0,17 p = 0,258 | 0,54 p = 0,000 |
| Ráfagas | 0,46 p = 0,001 | 0,30 p = 0,041 | 0,42 p = 0,003 |
| Dentro | 0,42 p = 0,004 | 0,18 p = 0,236 | 0,48 p = 0,001 |
| Fuera | 0,14 p = 0,339 | 0,03 p = 0,855 | 0,19 p = 0,200 |
| CV | -0,28 p = 0,056 | -0,21 p = 0,152 | -0,24 p = 0,106 |

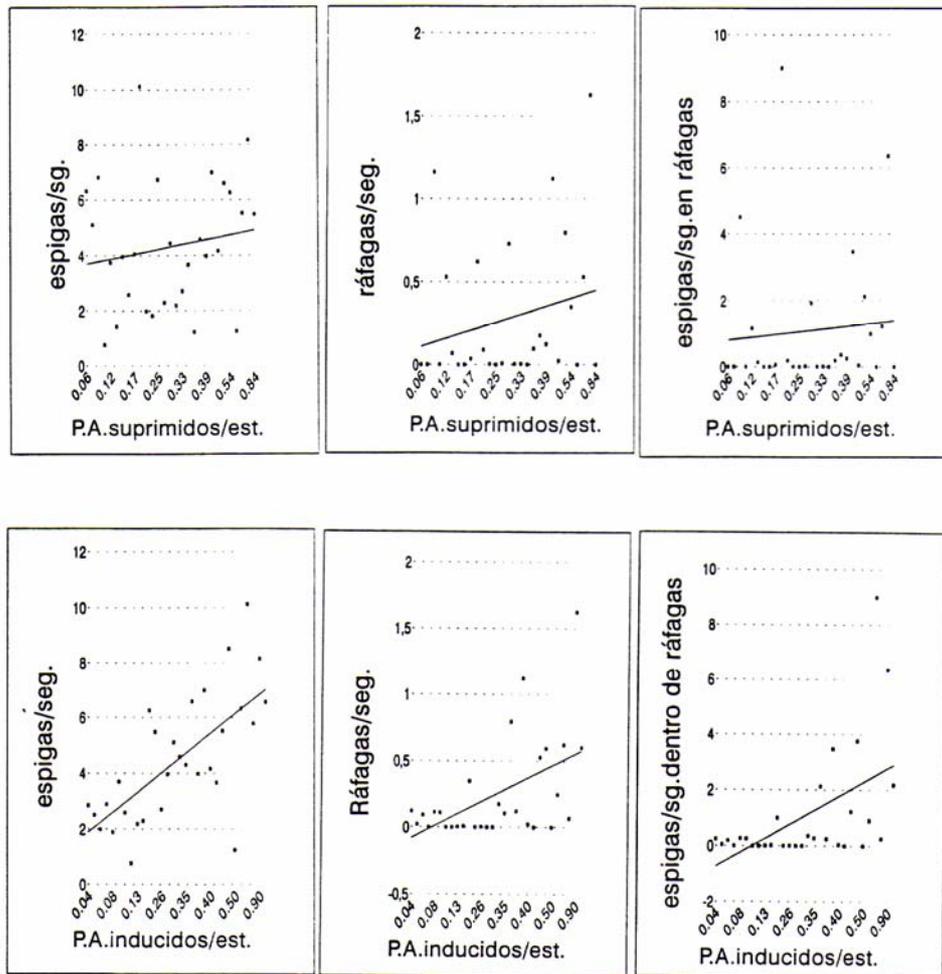


FIGURA 2.9. Correlación entre la potencia absoluta de inhibiciones y excitaciones con respecto a las diferentes VDs. de la actividad basal.

Con el fin de corroborar la información aportada por los estudios de correlación, se procedió a comparar los potenciales de acción modificados, los inducidos y los suprimidos, dividiendo la población de células estudiadas en dos grupos: Grupo 1, células con actividad basal por debajo de la media y grupo 2, células con actividad basal por encima de la media, los resultados se muestran en la tabla 2.3. Se observa cómo en las células cuyas variables de actividad basal (número de potenciales de acción/s, número de ráfagas/s y número de potenciales dentro de ráfaga) están por encima de la media se inducen más potenciales de acción por estímulo que en las células que están por debajo de esas medias ($p < 0,05$). No se encontró diferencias en cuanto al número de potenciales fuera de ráfagas y en cuanto al coeficiente de variación encontramos lo contrario, es decir, en las células cuyo CV está por debajo de la media se inducen más potenciales de acción por estímulo si bien, como hemos visto, la correlación no alcanzó la significación. Para las inhibiciones, como cabía esperar, no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos para ninguna de las variables.

TABLA 2.3. Diferencia de medias de potenciales de acción modificados, inducidos y, suprimidos considerando dos grupos de célula: Grupo 1= células con VDs por debajo de la media y grupo 2= Células con VDs por encima de la media.

| ESPIGAS/S (MEDIA = 4,09 ± 0,32) | |
|---------------------------------|--------------|
| Media PA modificados/estímulo | |
| Grupo 1 (26) | Grupo 2 (20) |
| 0,29 ± 0,06 | 0,59 ± 0,09 |
| $t_{44} = -2,85; p = 0,007$ | |
| Media PA inducidos/estímulo | |
| Grupo 1 (26) | Grupo 2 (20) |
| 0,12 ± 0,03 | 0,34 ± 0,07 |
| $t_{28,19} = -2,88; p = 0,008$ | |

| RAFAGAS/S (MEDIA = 0,22 ± 0,005) | |
|----------------------------------|--------------|
| Media PA modificados/estímulo | |
| Grupo 1 (34) | Grupo 2 (12) |
| 0,33 ± 0,06 | 0,7 ± 0,12 |
| $t_{44} = -3,12; p = 0,003$ | |
| Media PA inducidos/estímulo | |
| Grupo 1 (34) | Grupo 2 (12) |
| 0,15 ± 0,3 | 0,4 ± 0,009 |
| $t_{13,92} = -2,49; p = 0,026$ | |

| ESPIGAS/S (MEDIA = 4,09 ± 0,32) | |
|----------------------------------------|--------------|
| Media PA modificados/estímulo | |
| Grupo 1 (26) | Grupo 2 (20) |
| 0,29 ± 0,06 | 0,59 ± 0,09 |
| $t_{44} = -2,85; p = 0,007$ | |
| Media PA inducidos/estímulo | |
| Grupo 1 (26) | Grupo 2 (20) |
| 0,12 ± 0,03 | 0,34 ± 0,07 |
| $t_{26,19} = -2,88; p = 0,008$ | |

| ESPIGAS/S FUERA DE RAFAGAS (MEDIA = 3,15 ± 0,22) | |
|---------------------------------------------------------|--------------|
| Media PA inducidos/estímulo | |
| Grupo 1 (23) | Grupo 2 (23) |
| 0,14 ± 0,05 | 0,3 ± 0,05 |
| $t_{44} = -2,27; p = 0,028$ | |

| COEFICIENTE DE VARIACIÓN (MEDIA = 0,5 ± 0,04) | |
|------------------------------------------------------|--------------|
| Media PA modificados/estímulo | |
| Grupo 1 (28) | Grupo 2 (18) |
| 0,053 ± 0,08 | 0,26 ± 0,07 |
| $t_{44} = -2,47; p = 0,017$ | |
| Media PA inducidos/estímulo | |
| Grupo 1 (28) | Grupo 2 (18) |
| 0,29 ± 0,05 | 0,11 ± 0,04 |
| $t_{44} = 2,36; p = 0,023$ | |

2.4. DISCUSIÓN

La sustancia negra es una de las estructuras más densamente inervada por las células del PPN (Saper y Loevry, 1982; Jackson y Crossman, 1983; Moon Edley y Graybiel, 1983; Scarnati y col., 1984, 1986, 1987, 1988; Beninato y Spencer, 1988). Muchas terminales de fibras del PPN se arborizan extensamente en la sustancia negra con espinas y varicosidades axónicas que forman contactos sinápticos asimétricos con de las neuronas de la pars compacta de la SN y especialmente sobre neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (scarnati y col., 1988; Tokuno y col., 1988).

Se ha descrito una vía glutamatérgica PPN-SN que es capaz de inducir una respuesta excitatoria corta, con una latencia de 2-3 ms, en las neuronas de la sustancia negra pars compacta (Scarnati y col., 1986; Scarnati y col., 1987; Di Loreto y col., 1992). Nosotros mostramos aquí evidencias electrofisiológicas que sugieren que la acción del PPN sobre la actividad de las células A9 es más compleja que la que origina la respuesta excitatoria de latencia corta. La respuesta excitatoria de latencia corta, ha sido identificada en el 30% de las neuronas nigroestriatales (Scarnati y col., 1984, 1986, 1987, 1988; Di Loreto y col., 1992). En el presente experimento nosotros identificamos al menos una respuesta excitatoria o inhibitoria en el 84,78 % de las células A9 estudiadas. Estas respuestas, probablemente, no incluyen la respuesta de latencia corta descrita por Scarnati y col. (Scarnati y col., 1984, 1986, 1987, 1988) ya que en nuestro experimento los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral, un procedimiento que bloquea la respuesta excitatoria de latencia corta (Kelland et al 1990) con lo cual nos aseguramos de que las respuestas que obtenemos no son respuestas rebote de la respuesta excitatoria de latencia corta. Además, encontramos un alto porcentaje de respuestas inhibitorias (las respuestas descritas hasta ahora han sido siempre excitatorias).

Por otra parte nuestros datos sugieren que la acción de las células del

PPN sobre la actividad de las células A9 es compleja (mostrando excitaciones, inhibiciones o ambas) y puede estar inducidas por vías directas o indirectas PPN-SNc.

Estudios morfológicos han demostrado que la vía a PPN-SN está compuesta también por neuronas no glutamatérgicas Sacer y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983; Parent y De Bellefeuille 1983; Sugimoto y Hattori, 1984; Scarnati y col., 1986; Lee y col. 1988; Di Loreto y col., 1992), de hecho la población celular del PPN presenta una gran heterogeneidad bioquímica y electrofisiológica (Woolf y Butcher, 1986; Amstrong y col., 1983; Clements y Grant, 1990; Goldsmith y Van der Kooy, 1988; Kang y Kitai, 1990; Kimura y col., 1981; Scarnati y col., 1987a, 1987b; Spann y Grofova, 1992). Investigaciones electrofisiológicas han descrito tres tipos neuronales en el PPN (Leonard y Llinas, 1988; Kang y Kitai, 1990). Otros estudios han encontrado células que sintetizan acetilcolina, glutamato, sustancia P, atriopeptina, factor de crecimiento fibroblástico y óxido nítrico (Coté y Parent. 1992; Geula y col., 1993; Standaert y col., 1986; Woolf y col., 1986). Estas células presentan conexiones recíprocas y extensas con muchos núcleos cerebrales, mandando tanto proyecciones ascendentes que inervan diferentes estructuras talámicas, hipotalámicas, extrapiramidales, límbicas y corticales como proyecciones descendentes que inervan los núcleos reticular, pontino, vestibular y cerebelar, la médula espinal y la médula ventrolateral (Jackson y Crossman, 1983; Sofroniew y col., 1985; Rye y col., 1988; Goldsmith y Van der Kooy, 1988; Spann y Grofova, 1989; Woolf y Butcher, 1989 Yasui y col., 1990).

El haber encontrado un 56,41 % de células con una primera respuesta inhibitoria seguida por una segunda respuesta excitatoria y un 43,59 % de células con una primera respuesta excitatoria seguida de una 2ª respuesta inhibitoria nos podría llevar a pensar que un tipo de respuesta es consecuencia de la otra y que no se tratan de respuestas independientes. No obstante, aunque esto se pudiera dar en algún caso, no parece ser lo general ya que, como se muestra en la figura 2.4, las excitaciones y las inhibiciones coexisten en los mismos periodos de tiempo, aunque entre los 17-59 ms postestimulación la probabilidad para las inhibiciones es mayor que para las excitaciones, esta diferencia, probablemente, está relacionada

con la mayor duración de las respuestas inhibitorias (fig.2.6.). Si una respuesta fuera rebote de la anterior, lo que cabría esperar sería que aparecieran en periodos consecutivos.

Esta independencia entre las respuestas se reafirma al encontrar que acción excitadora es más efectiva sobre una subpoblación de células A9 ~ con un determinado modelo de actividad electrofisiológica, mientras que la acción inhibitoria, por su parte, es menos selectiva e igual de intensa en toda la población de células estudiadas. Así, encontramos que se inducen más potenciales de acción en aquellas células con mayor actividad en ráfagas y con más potenciales de acción dentro de ráfagas. Esta modalidad de descarga en ráfagas parece ser que es la más efectiva para la liberación de DA en el estriado (Gonon, 1988; Cherg, col., 1994), por lo que el PPN podría estar implicado en esta liberación.

No obstante, aunque ambas respuestas están mediadas por vías diferentes, la potencia absoluta (nº de potenciales de acción modificados por estímulo) es similar para las excitaciones y las inhibiciones que podría explicar porque la estimulación del PPN a 1hz de frecuencia no induce variaciones en la actividad basal de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales.

Las células del PPN inervan la pars reticulata de la sustancia negra y otras zonas del cerebro como el núcleo subtalámico o el núcleo entopeduncular que influyen directamente sobre la actividad de las células A9 (Grofová, 1975; Hattori y col., 1975; Bunney y Aghajanian, 1976; Cartel y Fibiger, 1978; Gerfen y col., 1982; Smith y Parent, 1988; Schumued y col., 1989; Robledo y Ferger, 1990; Smith y Grace, 1992). Las latencias de las respuestas encontradas aquí sugieren que una parte de las respuestas de las células A9 fueron producidas por una transmisión polisináptica mediada, tal vez, por estos núcleos. La respuesta en sí fue menor de 20 ms en el 47,5 % y menor de 10 ms en el 17,5% de los casos. Así, una parte de las respuestas podrían ser, probablemente, inducidas por una vía directa PPN-SNc. Como decíamos anteriormente, la respuesta excitatoria ha sido descrita como una sinapsis glutamatérgica que actúa sobre receptores no NMDA (Di Loreto y col., 1992; Scarnati y col., 1984, 1986, 1987, 1988). La acción electrofisiológica de proyecciones colinérgicas o no glutamatérgicas (Saper y Loewy, 1982; Parent y De Bellefeuille, 1983; Sugimoto y Hattori, 1984; Scarnati y col., 1984, 1986, 1987, 1988; Jackson y Crossman, 1983; Standaert y col., 1986; Woolf y Butcher, 1986, 1989; Tokuno y col., 1988; Lee y col., 1988; Geula y col., 1993; Coté y Parent, 1992; Di Loreto y col., 1992) sobre la actividad de las células A9 se conoce menos. Las respuestas de latencia media encontradas aquí podrían estar inducidas por estas otras vías PPN-SNc.

Por último, aún debemos asegurarnos de que estas respuestas están, efectivamente, originadas en células del PPN y no están

siendo originadas por la estimulación de fibras de paso Esta es una duda que nos surge, sobre todo, al encontrar una respuesta inhibitoria que no ha sido descrita en otros trabajos en los que se comunica una influencia del PPN sobre la SNc mediada por sustancias excitadoras (acetil colina, glutámico...).

3. EXPERIMENTO 3

Efectos sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales de la estimulación eléctrica del núcleo pedúnculo pontino contralateral.

3.1 OBJETIVOS

Puesto que existen evidencias de proyecciones contralaterales desde el PPN a la sustancia negra (Saper y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983; Moon Edley y Graybiel, Scarnati y col., 1984), los objetivos de este experimento fueron:

1.- Estudiar si la estimulación eléctrica del PPN produce algún tipo de respuesta en las células dopaminérgicas nigroestriatales de la SN contralateral, observando las latencias y la intensidad de las mismas en caso de producirse.

2.- Comparar los resultados obtenidos con los del experimento anterior en el que se estimuló el PPN ipsilateral.

3.2. MATERIAL Y MÉTODO

3.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental elegido para la realización de este tercer experimento está constituido por una variable intragrupo (estimulación eléctrica del PPN contralateral) con dos niveles: antes de la estimulación y durante la estimulación.

Las variables dependientes fueron:

1.- Variables dependientes de los HTPEs:

- Número de respuestas por célula.
- Latencia de inicio y duración de cada respuesta.
- Número de potenciales de acción modificados en los períodos con respuesta (POTENCIA ABSOLUTA) donde se puede distinguir:
 - * Número de potenciales de acción inducidos en los períodos de excitación por célula.
 - * Número de potenciales de acción suprimidos en los períodos de inhibición por célula.
- Porcentaje de potenciales de acción inducidos o suprimidos en relación a los esperados antes de la estimulación (POTENCIA RELATIVA).

2.- Variables dependientes de frecuencia y modelo de descarga descritas para el experimento 1.

La estimulación consistió en un pulso cuadrado de corriente de 300 μ A de intensidad, 0,3 ms de duración a 1 Hz de frecuencia. Las

características del electrodo de estimulación son las descritas en el método general.

3.2.2. SUJETOS EXPERIMENTALES

Se registraron 39 células dopaminérgicas nigroestriales en 7 ratas machos Sprague Dawley anestesiadas con hidrato de cloral (tal y como se ha descrito en el método general). Las coordenadas de estimulación del PPN fueron: 1,8 mm lateral a la línea media, 7,8 mm posterior a bregma y 7,3 mm ventral desde la duramadre (Paxinos y Watson, 1986).

Las células fueron consideradas como dopaminérgicas nigroestriales si cumplían los criterios expuestos en el método general. Además, las células utilizadas en este estudio pertenecen a ratas en las que se comprobó histológicamente que el electrodo de estimulación estuvo localizado en la región del PPN.

3.2.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los registros constaban de dos fases, una primera fase de 4 minutos en la que se registraba la actividad espontánea estable de la neurona y un segundo periodo, de 7 minutos aproximadamente, en el que se registraba la actividad basal al tiempo que se estimulaba el PPN.

3.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los análisis estadísticos se emplearon ANOVAs de una vía, con un factor de medidas repetidas (antes-durante la estimulación) y la T de Student para contraste de medias. Para el estudio de distribuciones en alguna de las variables, se empleó la prueba de bondad de ajuste χ^2 . Los contrastes se estimaron significativos cuando el error α fue inferior a 0,05. También se utilizaron diferencias de medias para muestras relacionadas y coeficientes de correlación de Pearson.

3.3. RESULTADOS

3.3.1 HISTOGRAMAS PERIESTÍMULO

Las células registradas presentaron las características descritas para las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales así como las registradas en los experimentos anteriores. La media de las latencias antidrómicas por estimulación estriatal fue de $10,52 \pm 0,39$ [rango: 8 - 15,96] ms y la media de la velocidad de conducción obtenida fue de $0,56 \pm 0,02$ [rango: 0,35-0,78] m/s.

Los electrodos de estimulación del PPN, según mostraron las comprobaciones histológicas, estaban bien localizados (figura 3.1). En la figura 3.2 se muestran cuatro ejemplos de los histogramas de tiempos periéstímulos obtenidos tras la estimulación del PPN contralateral a la sustancia nigra.

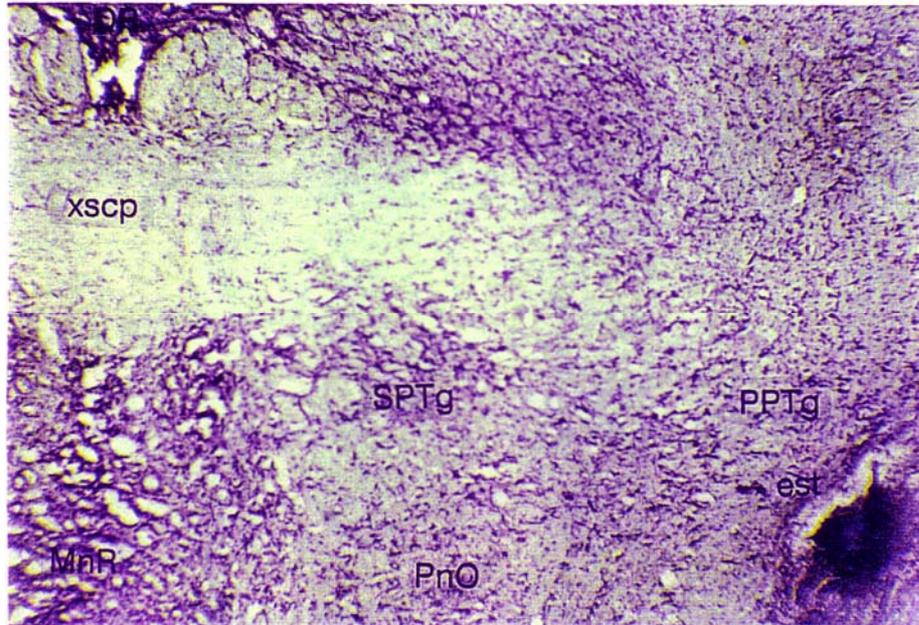


FIGURA 3.1. Comprobación histológica de la situación del electrodo de estimulación del PPN tomando como referencia el atlas de Paxinos y Watson (1986). DR= rafe dorsal, xscp= decusación del pedúnculo cerebelar superior, PnO = núcleo reticular pontino oral, SPTg = núcleo tegmental subpeduncular pontino, PPTg= núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPN); esf = marca del electrodo de estimulación.

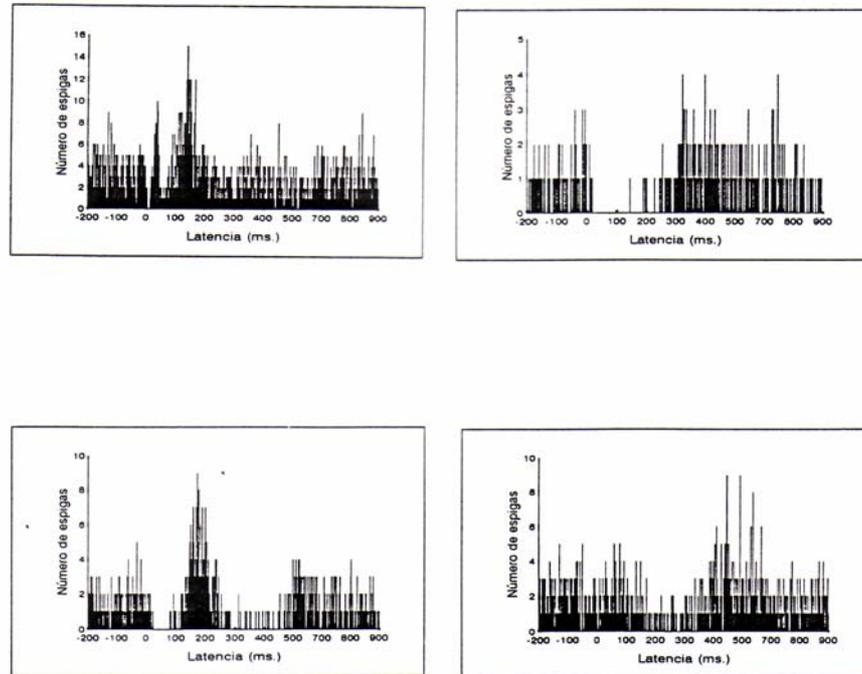


FIGURA 3.2. HTPEs de cuatro células catalogadas como dopaminérgicas nigroestriatales. Estos histogramas se obtuvieron al sumar los PAs registrados en cada ms desde 200 ms antes de cada estimulación del PPN contralateral hasta 800 ms transcurridos después de la aplicación de los mismos.

De las 39 células registradas, el 69,23 % mostró alguna respuesta y el 51,85 % mostró más de una respuesta a la estimulación del PPN contra-lateral. De las células que respondieron, la primera respuesta fué una excitación en el 22,22 % de las células y una inhibición en el 77,78 %. Cuando se encontraron células con más de una respuesta, la segunda respuesta fue una excitación en el 85,71 % de los casos y una inhibición en el 14,28 % de los casos (figura 2.3).

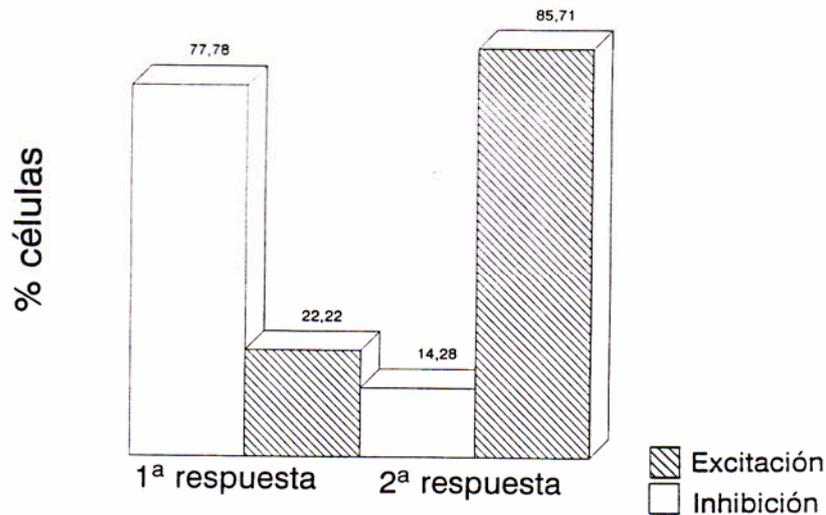


FIGURA 3.3. Porcentaje sobre el total de células que presentaron una inhibición y porcentaje de las que presentaron una excitación, como primera respuesta y, de las células con más de una respuesta, porcentaje de células que presentaron una inhibición y las que presentaron una excitación como segunda respuesta, tras la estimulación del PPN contralateral.

El porcentaje de células excitadas o inhibidas en los distintos períodos de 1 ms tras la estimulación del PPN se muestra en la figura 3.4.

Como se observa, aparece una densidad mayor de células inhibidas y excitadas en el intervalo de 0-100 ms postestimulación, una densidad mayor de células excitadas en el intervalo de 100-200 ms y a continuación otra de células inhibidas en el intervalo 200-400 ms. Después de los 500 ms no aparece ningún tipo de respuesta. Entre los 0-100 ms y los 300-400 ms el porcentaje de células inhibidas fue mayor que el de células excitadas ($p < 0,05$ de la χ^2 excitación vs. inhibición).

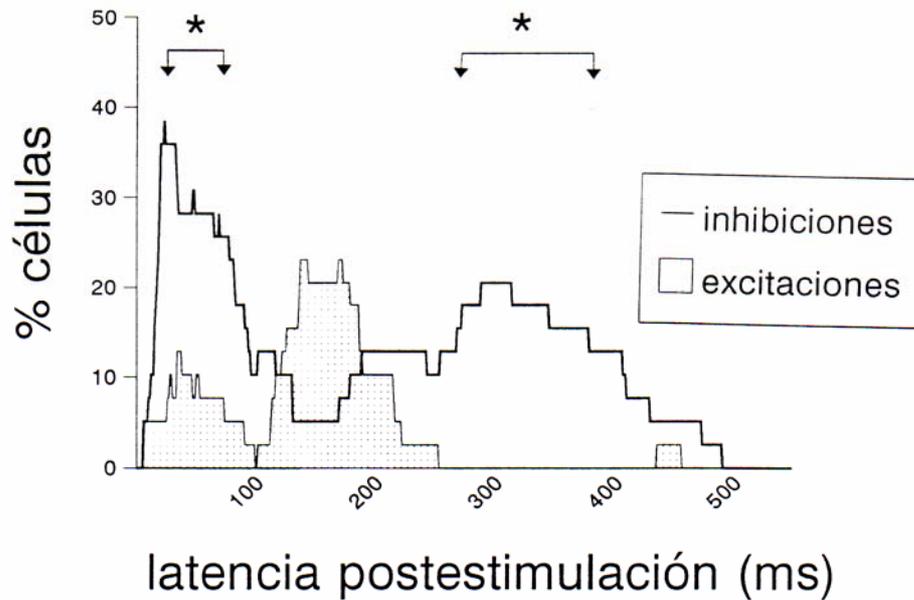


FIGURA 3.4. Porcentaje de células A9 que se encontraban excitadas o inhibidas en los distintos periodos de 1 ms (marcado entre flechas) posteriores a la estimulación del PPN contralateral ($p < 0,05$ tras la χ^2 excitación vs. inhibición).

El 51,22 % de las células tuvieron una latencia de respuesta postestímulo menor de 30 ms y un 9,76 % inferior a 10 ms. En la figura 3.5 se muestra el porcentaje de respuestas en función de las latencias postestimulación. Se observa como la mayoría de las respuestas inhibitorias se inician en períodos anteriores a los 50 ms, con un predominio de respuestas inhibitorias entre los 20-30 ms. Las latencias de las respuestas excitatorias se agrupan entre los 10-50 ms y entre los 100-150 ms.

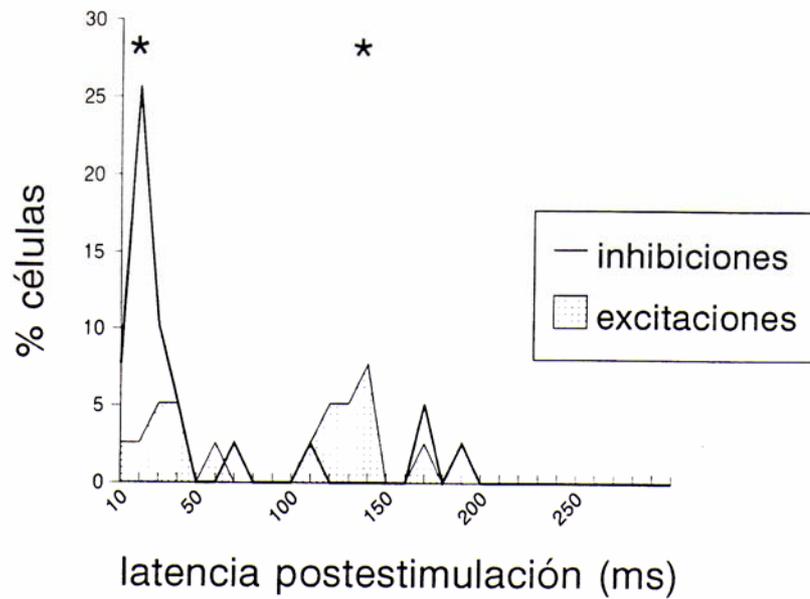


Figura 3.5. Histograma de las latencias (intervalos de 10 ms.) de las distintas respuestas de las células A9 a la estimulación del PPN contralateral.

En cuanto a la duración de esta respuesta, la figura 3.6 muestra cómo en la primera respuesta las inhibiciones (media primera respuesta = 79,24 t 17,05, media segunda respuesta = 170 + ' 26) son más duraderas que las excitaciones (media primera respuesta = 31.57 t 8,53 media segunda respuesta = 59,5 t 11,63).

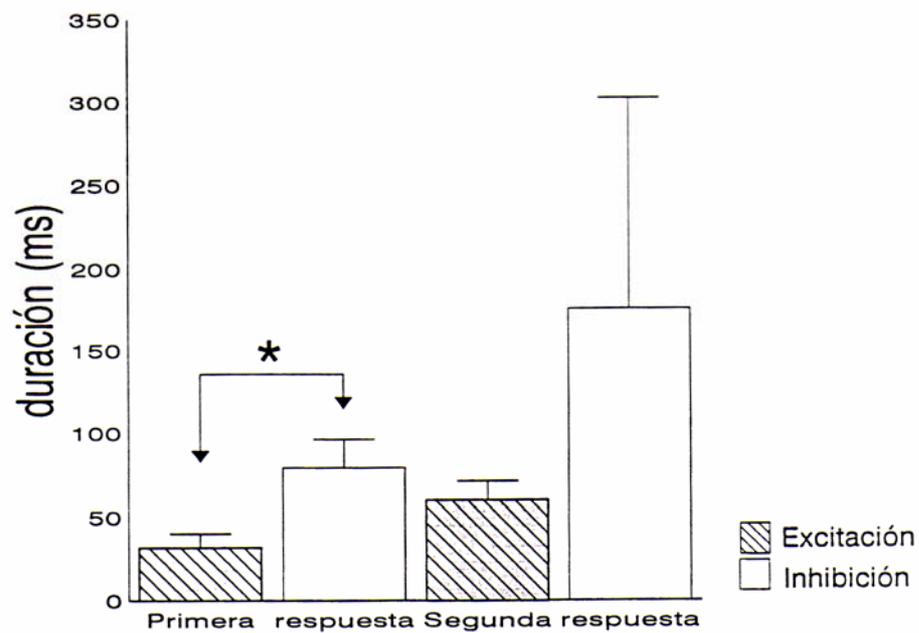


FIGURA 3.6. Media y error estándar de la duración de las distintas respuestas de las células A9 a la estimulación del PPN contralateral.

A pesar de las diferencias obtenidas, hasta ahora, entre las inhibiciones y las excitaciones, al comparar la potencia absoluta número de potenciales de acción inducidos o suprimidos por estímulo encontramos que fue similar para las inhibiciones y para las excitaciones (Figura 3.7).

Al comparar las potencias relativas (porcentaje de modificación de potenciales de acción, en relación a los potenciales de acción esperados sin estimulación), encontramos que las excitaciones son muchos más intensas en la primera que la segunda respuesta mientras que las inhibiciones son igual de potentes para ambos tipos de respuestas (inhibitorias, figura 3.8 A, y excitatorias, figura 3.8 B).

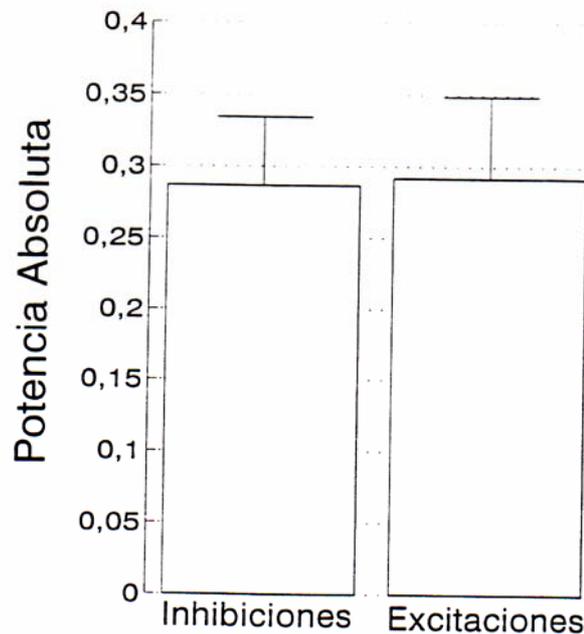


FIGURA 3.7. Media y error estándar de la potencia absoluta en la primera y segunda respuestas excitatorias e inhibitorias tras la estimulación del PPN contralateral.

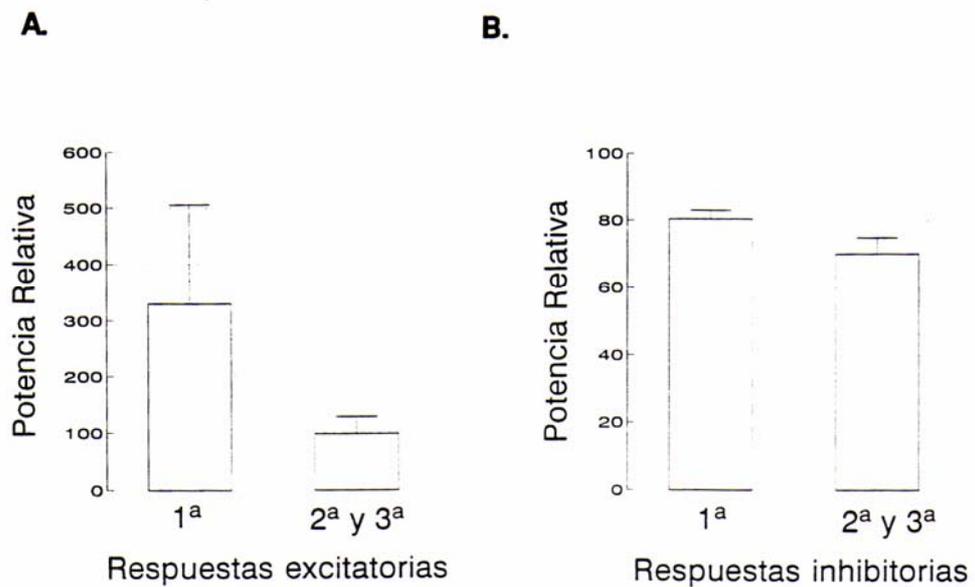


FIGURA 3.8. Media y error estándar de la potencia relativa en la primera y segunda respuestas excitatorias e inhibitorias tras la estimulación del PPN contralateral.

Al estudiar el porcentaje de células excitadas o inhibidas en los distintos períodos de 1 ms tras la estimulación del PPN contralateral (figura 3.4), observamos una mayor probabilidad de excitación entre 0 y 100 ms y entre 100 y 200 ms y, una mayor probabilidad de inhibición entre 0 y 100 ms y entre 200 y 400 ms. Seguidamente, procedimos a estudiar la posible relación entre las diferentes respuestas y con respecto a las variables de la actividad basal con el fin de estudiar si la tendencia de las células a estar excitadas o inhibidas en cada uno de esos periodos estaba relacionada y, adicionalmente, si estas tendencias guardan algún tipo de relación con la actividad espontánea. Realizamos un estudio de correlaciones. Los resultados con las correlaciones que resultaron significativas se recogen en la la tabla 3.1. Encontramos correlación significativa entre las

excitaciones en el intervalo de 100 a 200 ms postestimulación con las de los intervalos de las inhibiciones, con la frecuencia de descarga y con la frecuencia de descarga fuera de ráfagas. Con el fin de valorar si la correlación encontrada entre las respuestas excitatorias y las inhibitorias podía significar que unas eran rebotes de otras, calculamos a varianza explicada a partir de las correlaciones (r^2) fue de 14,22 % la de excitaciones de 0 a 100 ms con respecto a las inhibiciones de 0 a 100 ms y de un 15,4% con respecto a las inhibiciones de 200 a 400 ms.

TABLA 3.1. Coeficientes de correlación de Pearson entre la respuesta excitatoria entre los ms 100-200 y las respuestas inhibitorias tras la estimulación del PP,N contralateral así como con respecto a las variables de actividad basal espigas/s y espigas/s fuera de ráfagas.

| EXCITACIONES DE 100 A 200 ms | | |
|------------------------------|----------------------------|-------|
| | coeficiente de correlación | p |
| inhibiciones 0-100 | 0,371 | 0,049 |
| inhibiciones 200-400 | 0,392 | 0,014 |
| espigas/s | 0,323 | 0,045 |
| espigas/s fuera de ráfagas | 0,348 | 0,030 |

Al objeto de profundizar en la posible relación entre las variables de actividad espontánea y las respuestas, comparamos la sensibilidad a la estimulación de las células que se situaban por debajo o por encima de la media de cada variable de actividad espontánea. Esto es, las células fueron divididas en dos grupos en función de que su frecuencia de descarga fuera inferior o superior a la media de esta, variable y se compararon la potencia absoluta de excitaciones e inhibiciones entre esos dos grupos. De forma similar, se usaron el resto de los parámetros de la actividad espontánea (tabla 3.2.).

TABLA 3.2. Medias y contrastes estadísticos de potenciales de acción modificados, inducidos y suprimidos en las células agrupadas según su actividad espontánea: Grupo 1= células con VDs (espigas/s, espigas s fuera de ráfagas y coeficiente de variación) con un valor inferior a la media de a variable estudiada y grupo 2= Células con un valor inferior VDs por encima de la mediana a ce variable estudiada.

| ESPIGAS/S (MEDIA = 3,62 ± 0,29) | |
|----------------------------------------------------------|--------------|
| Media de potenciales de acción inducidos de 0 a 100 ms | |
| Grupo 1 (23) | Grupo 2 (16) |
| 0,05 | 0,24 |
| $t_{18,5} = -2,7; p = 0,014$ | |
| Media de potenciales de acción inducidos de 100 a 200 ms | |
| Grupo 1 (23) | Grupo 2 (16) |
| 0,02 | 0,2 |
| $t_{34,1} = -2,56; p = 0,02$ | |

| ESPIGAS/S FUERA DE RAFAGAS (MEDIA = 2,98 ± 0,2) | |
|----------------------------------------------------------|--------------|
| Media de potenciales de acción inducidos de 100 a 200 ms | |
| Grupo 1 (22) | Grupo 2 (17) |
| 0,06 | 0,18 |
| $t_{20,24} = -2,12; p = 0,047$ | |

| COEFICIENTE DE VARIACION (MEDIA = 0,45 ± 0,03) | |
|----------------------------------------------------------|--------------|
| Media de potenciales de acción inhibidos de 0 a 100 ms | |
| Grupo 1 (24) | Grupo 2 (15) |
| 0,14 | 0,043 |
| $t_{37,67} = 2,63; p = 0,01$ | |
| Media de potenciales de acción inhibidos de 200 a 400 ms | |
| Grupo 1 (24) | Grupo 2 (15) |
| 0,09 | 0,01 |
| $t_{26,58} = 2,30; p = 0,03$ | |

3.3.2. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS TRAS LA ESTIMULACIÓN DEL PPN IPSILATERAL CON LOS DEL CONTRALATERAL

Por último, comparamos las características de las distintas respuesta encontradas en este experimento con las obtenidas tras la estimulación del PPN ipsilateral (expuestos en el experimento 2). Como muestran las tablas 3.3., 3.4. y 3.4 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los histogramas periestímulo, al comparar ambos grupos.

TABLA 3.3. Comparación de las medias de potencia absoluta y potencia relativa total, de excitaciones y de inhibiciones (ver material y, método) tras la estimulación del PPN ipsilateral y contralateral.

| | n1 | n2 | IPSILAT. media | CONTRA media | t | p |
|-----------------------|----|----|--------------------|-------------------|------------|------|
| Pot. Ab. Total | 39 | 26 | 0,5 ± 0,06 | 0,4 ± 0,07 | (63)=0,74 | 0,46 |
| Pot. Ab. Inhibic. | 29 | 22 | 0,3 ± 0,04 | 0,3 ± 0,05 | (49)=0,58 | 0,56 |
| Pot. Ab. Excitac. | 30 | 17 | 0,3 ± 0,04 | 0,3 ± 0,06 | (45)=0,63 | 0,53 |
| Pot. Rel. Total | 39 | 27 | 315,06 ± 126,73 | 179,08 ± 49,68 | (64)=0,86 | 0,39 |
| Pot. Rel. Excitac. | 29 | 22 | 64,84 ± 4,01 | 71,03 ± 3,27 | (49)=-1,14 | 0,26 |
| Pot. Rel. Inhibic. | 30 | 17 | 368,18 ± 163,78 | 191,72 ± 81,26 | (45)=0,78 | 0,44 |

TABLA 3.4. Medias de las latencias y de la duración de las respuestas obtenidas tras la estimulación del PPN ipsilateral o contralateral y su contraste estadístico.

| | n1 | n2 | IPSILAT. media | CONTRA L. media | t | p |
|-----------------------------------|----|-----|-------------------|--------------------|-------------------|-------|
| lat. inicio 1ª resp. | 39 | 27, | 29,7 ± 3,99 | 34,9 ± 8,7 | (64) = -0,6 | 0,55 |
| lat. inicio 2ª resp. | 21 | 14 | 146,81 ± 17,58 | 134,36 ± 26,54 | (33) = 0,41 | 0,69 |
| lat. inicio 1ª rep. excit. | 17 | 6 | 27,53 ± 4,9 | 23,5 ± 7,49 | (21) = 0,43 | 0,67 |
| lat. inicio 1ª resp. inhib. | 22 | 21 | 31,36 ± 6 | 38,19 ± 11 | (41) = -0,55 | 0,585 |
| lat. inicio 2ª resp. excit. | 13 | 12 | 175,31 ±19,41 | 137,17 ± 29,81 | (23) = 1,09 | 0,287 |
| lat. inicio 2ª resp. inhib. | 8 | 2 | 100,5 ± 27,8 | 117,5 ± 71,5 | (8) = -0,26 | 0,79 |
| duración 1ª resp. | 39 | 27 | 75,28± 9,65 | 68,67 ± 13,86 | (64) = 0,4 | 0,687 |
| duración 2ª resp. | 21 | 14 | 87,52± 10,39 | 76,14 ± 20,01 | (33) = 0,55 | 0,585 |
| duración 1ª resp. excit. | 17 | 6 | 37,3± 7,12 | 31,67 ± 8,53 | (21) = 0,43 | 0,67 |
| duración 1ª resp. inhib. | 22 | 21 | 104,64± 13,23 | 79,24 ± 17,05 | (41) = 1,18 | 0,244 |
| duración 2ª resp. excit. | 13 | 12 | 71,31± 3,7 | 59,5 ± 11,63 | (13,23) = 0,97 | 0,35 |
| duración 2ª resp. inhib. | 8 | 2 | 113,87± 24,7 | 176 ± 0,126 | (1,08) = -0,48 | 0,71 |

TABLA 3.5. Porcentaje de células que muestran respuestas tras la estimulación del PPN ipsilateral o contralateral y los valores obtenidos tras el contraste de proporciones.

| | contralateral | ipsilateral | Z | p >0,05 |
|----------------------------------------|---------------|-------------|--------|---------|
| células que responden | 69,23 | 84,78 | - 1,7 | n.s. |
| cél. con más de 1 resp. | 51,85 | 53,84 | - 0,42 | n.s. |
| cél. con 1 resp. | 48,14 | 46,15 | 0,18 | n.s. |
| cél. con al menos 1 inhib. | 81,48 | 74,35 | 0,78 | n.s. |
| cél. con al menos 1 excitac. | 59,25 | 76,92 | - 1,7 | n.s. |
| cél. con 1 ^a resp. 1 inhib. | 77,77 | 56,41 | 1,32 | n.s. |
| cél. con 1 ^a resp. 1 excit. | 22,22 | 43,58 | - 1,32 | n.s. |
| cél. con 2 ^a resp. 1 inhib. | 7,4 | 20,51 | -1,46 | n.s. |
| cél. con 2 ^a resp. 1 excit. | 44,44 | 33,33 | 1,7 | n.s. |
| cél. inhib-excit | 40,74 | 33,33 | 1,22 | n.s. |
| cél. excit-inhib | 18,51 | 17,94 | 0,24 | n.s. |
| cél. inhib-inhib. | 3,7 | 2,56 | 0,32 | n.s. |
| cél. excit-excit. | 3,7 | 0 | 1,7 | n.s. |

3.4. DISCUSIÓN

En el presente experimento encontramos que la estimulación eléctrica del PPN contralateral produce respuestas tanto excitatorias como inhibitorias en el 69% de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales registradas. La latencia tardía encontrada para algunas respuestas sugieren que una parte de las respuestas de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales tras la estimulación del PPN contralateral estuvieron mediadas por transmisión polisináptica. No obstante en el 51,22 % de los casos estas respuestas presentaron latencias inferiores a 33 ms y en el 9,76 % las respuestas se produjeron antes de los 10 ms. Así, muchas de estas respuestas, tal vez, estén mediadas por vías directas desde el PPN contralateral a la SN.

De las células que tuvieron más de una respuesta la primera respuesta era con más frecuencia una inhibición (77,78 % que una excitación (22,22%), pero en la segunda respuesta predominaban las excitaciones (85, 71%) frente a las inhibiciones (14,28%). Por otra parte, las inhibiciones fueron más duraderas que las excitaciones. A pesar de estas diferencias, la potencia de ambas respuestas fue similar, siendo las primeras respuestas más intensas (mayor potencia relativa) que las segundas. De estos datos y de la figura 3.4, en la que podemos separar cuatro tipos de respuestas diferenciadas por ser o excitatoria o inhibitoria y por sus latencias, nos da la impresión de que las respuestas más tardías podrían ser respuestas rebote de las más tempranas. Así, podemos distinguir dos respuestas inhibitorias (una de 0 a 100 ms y otra de 200 a 400 ms) y dos respuestas excitatorias (una de 0 a 100 ms y otra de 100 a 200 ms). Para descartar o confirmar esta impresión, estudiamos la correlación existente entre las diferentes respuestas (Tabla 3.1). Encontramos una correlación significativa entre las excitaciones de 100 a 200 ms y ambas respuestas inhibitorias, no obstante, como indica la varianza explicada esta correlación no es lo suficientemente grande para poder decir que unas respuestas son consecuencia de otras.

Por otra parte, también quisimos estudiar las posibles relaciones entre las

diferentes respuestas de las células NSDA tras la estimulación del PPN contralateral y su actividad electrofisiológica basal. Es decir, si existía o no alguna relación poblacional que determinara el tipo de respuesta obtenida. Para ello en primer lugar, calculamos la media de la potencia absoluta de las excitaciones (P.A inducidos/estímulo) y formamos dos grupos. Un grupo con aquellas células en las que la variable de la actividad basal estuviera por encima de la media y otro grupo cuya variable de actividad basal estuviera por debajo de la media. Encontramos que se producen más potenciales de acción en todas las respuestas excitatorias de las células más rápidas; en las células con potenciales de acción fuera de ráfagas por encima de la media, se inducen más potenciales de acción entre 100 y 200 ms y en las células más regulares (CV por debajo de la media) también se suprimen más potenciales de acción por estímulo que en las más irregulares (CV por encima de la media)

En definitiva estos resultados no sólo reafirman la independencia entre los diferentes tipos de respuesta sino que además evidencian una distribución poblacional para cada tipo de respuesta. No obstante, no cabría esperar que el PPN modificara la frecuencia, puesto que la potencia absoluta de las excitaciones e inhibiciones son iguales (Fig. 3.7), sino más bien que desplazara en el tiempo a los potenciales de acción de las células NSDA en sintonía con la actividad del PPN.

Por último comparamos estas respuestas obtenidas tras la estimulación eléctrica del PPN sobre las NSDA contralaterales con las encontradas al estimular el PPN ipsilateral y no encontramos ninguna diferencia entre ambos tipos de estimulación. Es decir, la influencia del PPN contralateral sobre la actividad de las células NSDA es tan importante como la influencia ipsilateral, mucho más estudiada hasta ahora.

Existen diferentes estudios sobre los mecanismos ipsilaterales que regulan la actividad de las NSDA pero son pocos los trabajos acerca de la influencia contralateral sobre la actividad de estas células. Algunos estudios han mostrado que, manipulaciones unilaterales inducen cambios en las células dopaminérgicas contralaterales. Así, modificaciones de la neurotransmisión dopaminérgica de un lado del

cerebro, alteran la liberación de DA en el caudado y en la SN contralateral (Nieoullon y col., 1977; Leviel y col., 1979). La inyección en la SN contralateral de muscimol, un agonista GABAérgico, o la estimulación eléctrica de la misma, provoca cambios metabólicos en varias estructuras extrapiramidales de ambos lados del cerebro, incluyendo la SNc (Savaki y col., 1983; Dermon y col., 1990), y modifica la probabilidad de generación de potenciales de acción de las neuronas NSDA (Castellano y Rodríguez., 1991). Así mismo, la separación de ambos hemisferios mediante una comisurotomía, modifica tanto la frecuencia como el patrón de descarga de las NSDA (Castellano, y Rodríguez., 1993). El entendimiento de la asimetría de los sistemas dopaminérgicos es un factor muy importante para comprender la lateralización conductual (Diaz y col., 1987; Castellano y col., 1987; Castellano y col., 1989; Rodríguez, y Afonso.). No obstante, hasta ahora, no se ha demostrado la existencia de una proyección directa entre ambos sistemas dopaminérgicos, por lo que esta interdependencia, probablemente, ha de estar mediada por otras estructuras.

Está bien establecida la existencia de extensas proyecciones recíprocas entre el PPN y la SN del mismo lado cerebral (Saper y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983; Parent y De Bellefeuille, 1983; Sugimoto y Hattori, 1984; Scarnati y col., 1984, 1986, 1987, 1988; ; Beninato y Spencer, 1988; Tokuno y col., 1988; Lee y col., 1988; Di Loreto y col., 1992), pero también se ha descrito que el PPN de un lado cerebral proyecta a la SN contralateral (Saper y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983; Moon Edley y Graybiel, Scarnati y col., 1984). No obstante, si bien existen diferentes datos sobre la influencia electrofisiológica del PPN sobre las NSDA ipsilaterales, muy poco hemos encontrado referente a la influencia desde el PPN contralateral. Es importante destacar este efecto de la estimulación del PPN contralateral en relación al ipsilateral puesto que parece deducirse una importante regulación contralateral, o al menos de similar potencia que la ipsilateral, lo que implica que ambos PPNs al actuar sobre la SN generan un alto grado de modulación bilateral de los dos sistemas dopaminérgicos nigroestriatales.

4. EXPERIMENTO 4

Efecto sobre la actividad electrofisiológica de las neuronas NSDA de la estimulación eléctrica de los núcleos pedúnculo pontinos ipsi y contralateral tras su lesión.

4.1. OBJETIVOS

Tras los experimentos realizados hasta ahora, nos surge la duda de en qué medida las respuestas observadas en las células A9 tras la estimulación eléctrica del PPN ipsi o contralateral son el resultado de la estimulación de los cuerpos celulares de estas zonas y en qué medida son debidas a la estimulación de vías de paso. Diseñamos, por tanto, este cuarto experimento con los siguientes objetivos:

- 1)** Estudiar el efecto sobre la actividad eléctrica espontánea de las células A9 de la lesión de los núcleos pedúnculo pontinos ipsi y contralateral.

- 2)** Contrastar las respuestas obtenidas tras la estimulación eléctrica de ambos núcleos intactos con las respuestas que se obtengan de la estimulación eléctrica de los mismos lesionados.

4.2. MATERIAL Y MÉTODO

4.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental elegido para la realización de este experimento estaba constituido por dos variables independientes intergrupo: a) lado de estimulación (ipsilateral vs contralateral) y b) lesión (control vs lesionadas). Se registró la actividad espontánea durante un período de al menos 4 minutos y un segundo período de aproximadamente 7 minutos en el que se estimulaba el PPN. Se estudiaron las siguientes variables dependientes (Vds):

1. Variables dependientes de los HTPEs:

- Número de respuestas por célula.
- Latencia de inicio y duración de cada respuesta.
- Número de potenciales de acción modificados en los períodos con respuesta (POTENCIA ABSOLUTA) donde se puede distinguir:
 - * Número de potenciales de acción inducidos en los períodos de excitación por célula.
 - * Número de potenciales de acción suprimidos en los períodos de inhibición por célula.
- Porcentaje de potenciales de acción inducidos o suprimidos en relación a los esperados antes de la estimulación (POTENCIA RELATIVA).

2. Variables dependientes de frecuencia y modelo de descarga descritas para el experimento 1.

4.2.2. SUJETOS EXPERIMENTALES Y PROCEDIMIENTO PARAL LAS LESIONES

Las lesiones se realizaron con procedimientos estereotáxicos mediante la administración de ácido kaínico. Dos grupos de ratas fueron lesionadas, uno ipsilateralmente (n = 9) a la SN que iba a ser registrada y otro contralateralmente (n = 7). Se usaron otros dos grupos de ratas que recibieron el mismo tratamiento con la excepción de que sólo se inyectaba el vehículo, bien en el lado ipsilateral (n = 4) bien en el lado contralateral (n = 5).

Las lesiones se realizaban una semana antes de hacer los registros electrofisiológicos. Media hora antes de iniciar la lesión, se administraba, subcutáneamente, 10 mg/Kg de Diazepam (Valium) para prevenir posibles ataques epilépticos. Los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de 80 mg/Kg de ketamina (Imalgene 500. Rone Mérieux), el animal era colocado en el estereotáxico, con la barra de los incisivos a -3,3 mm por debajo de la línea interaural. Tras el rasurado del pelo de la parte dorsal de la cabeza, se reafizaba una incisión longitudinal del cuero cabelludo, procediéndose a trepanar el cráneo en el lugar correspondiente a la entrada de la aguja. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas fueron: 7,8 mm posterior a bregma, 1,8 mm a la derecha o a la izquierda de la línea media y 6,8 mm inferior a la duramadre. La inyección se realizó con una jeringa Hamilton de microprecisión, de volumen total de 10 ml y aguja de 0,4 mm de diámetro externo, con la punta recta. El neurotóxico empleado fue ácido kaínico (SIGMA) que se disolvió, inmediatamente antes de la inyección, en una solución tampón salina fosfato (pH=7,4). Se inyectó 0,8 µg de ácido kaínico en un volumen de 0,2 µl y a una velocidad de 0,1 µl/minuto. Una vez finalizada la inyección, se mantenía la aguja en la misma posición durante

5 minutos para que difundiera la solución. Para los animales de los grupos controles, se siguió el mismo procedimiento, pero se les inyectaba sólo el vehículo sin el neurotóxico. Finalmente, se procedía a la suturación de la herida y se marcaba y colocaba el animal en una jaula individual.

En total se registraron 143 neuronas dopaminérgicas nigroestriatales; 29 en las ratas controles ipsilaterales, 32 en las controles contralaterales, 47 en las lesionadas en el PPN ipsilateral y 35 en las lesionadas en el PPN contralateral.

4.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los contrastes de medias se empleó el test de la t-de Student. Para contrastar proporciones se utilizó la Z y para el estudio de distribuciones en alguna de las variables se empleó la prueba de bondad de ajuste χ^2 . Los contrastes se estimaron significativos cuando el error α fue inferior a 0,05

4.3. RESULTADOS

4.3.1. HISTOGRAMAS PERIESTÍMULO

En la tabla 4.1 se muestra las latencias antidrómicas y la velocidad

de conducción de las células registradas pertenecientes a los cuatro grupos utilizados. No encontramos diferencias estadísticas entre los cuatro grupos ($F_{3,29}=0,74$, $p = 0,53$;)

TABLA 4.1. *Media \pm error estándar de las latencias antidrómicas por estimulación eléctrica del estriado ipsilateral y de la velocidad de conducción de los cuatro grupos de ratas utilizadas: Ratas controles estimuladas en el PPN ipsilateral, ratas controles estimuladas en el PPN contralateral, ratas lesionadas y estimuladas en el PPN ipsilateral y ratas lesionadas y estimuladas en el PPN contralateral.*

| GRUPO | LATENCIA ANTIDRÓMICA | VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN |
|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| Control ipsilateral | 10,60 \pm 0,24 | 0,59 \pm 0,02 |
| Control contralateral | 10,59 \pm 0,36 | 0,58 \pm 0,02 |
| Lesión ipsilateral | 10,73 \pm 0,42 | 0,60 \pm 0,02 |
| Lesión contralateral | 9,94 \pm 0,32 | 0,63 \pm 0,02 |

Al comparar la actividad basal de las neuronas controles con la actividad basal de los grupos con lesión del PPN no encontramos diferencias (Tabla 4.2).

Una vez finalizados los registros electrofisiológicos, los animales fueron perfundidos y antes de procesar los datos se comprobaba histológicamente la situación de la lesión y del electrodo de estimulación. En la figura 4.1 se muestra un ejemplo de esta comprobación.

TABLA 4.2. T de Student y probabilidad de la diferencia de medias entre las distintas variables de la actividad basal de los grupos cotroles vs. grupos con el PPN lesionado. No encontramos ninguna diferencia estadística. (Dentro= espigas/s dentro de ráfagas; Fuera= espigas/s fuera de ráfagas; CV= coeficiente de variación).

| | control ipsilateral vs lesionadas ipsilateral | | control contralateral vs lesionadas contralateral | |
|-----------|-----------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------|-------|
| | t | p | t | p |
| Espigas/s | (74) = 0,134 | 0,723 | (65) = 0,059 | 0,239 |
| Ráfagas/s | (42,74) = 0,079 | 0,163 | (65) = 0,048 | 0,576 |
| Dentro | (74) = 0,249 | 0,245 | (65) = 0,214 | 0,525 |
| Fuera | (74) = 0,115 | 0,710 | (65) = 0,273 | 0,419 |
| CV | (74) = -0,037 | 0,387 | (65) = -0,075 | 0,126 |

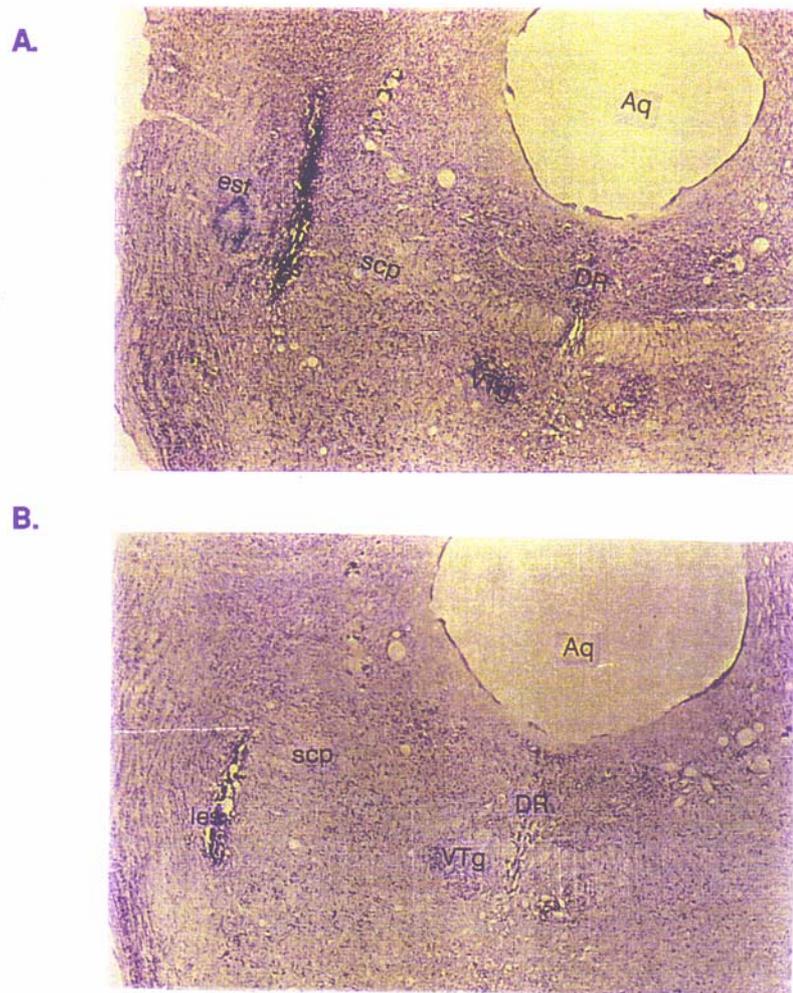
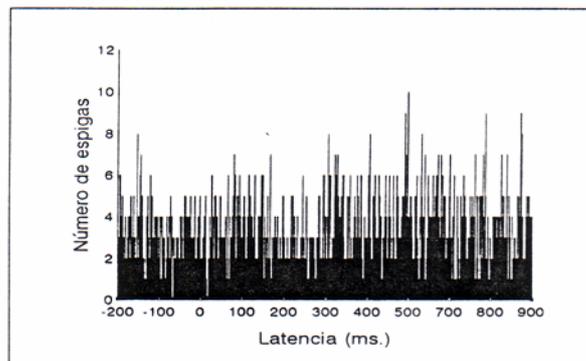
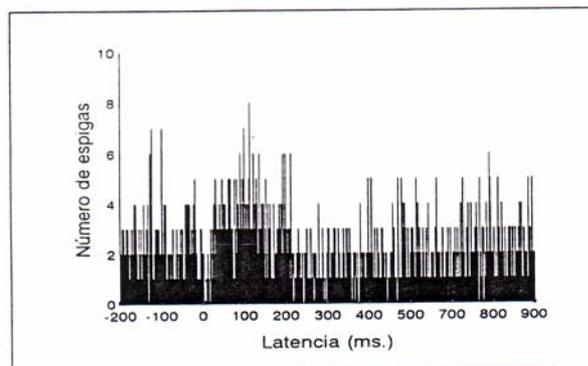


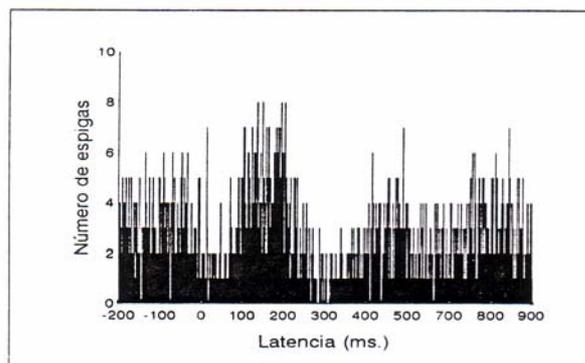
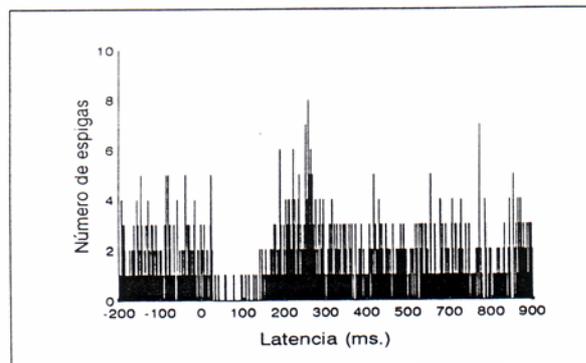
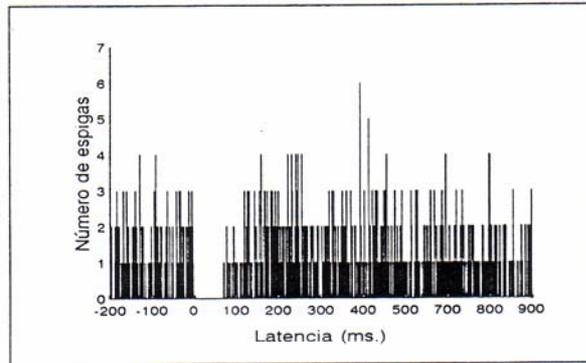
FIGURA 4.1. Comprobación histológica de la situación de la lesión y del electrodo de estimulación del PPN tomando como referencia el atlas de Paxinos y Watson (1986). Aq= acueducto; DR= rafe dorsal; scp= pedúnculo cerebelal superior, VTg= núcleo tegmental ventral; est= marca del electrodo de estimulación; les=lesión. En A se puede observar el trayecto de la aguja y la marca del electrodo de estimulación y en B el la lesión.

La estimulación eléctrica tanto del PPN ipsilateral como el PPN contralateral, previamente lesionados, hizo desaparecer casi por completo las respuestas obtenidas en las ratas controles. En la figura 4.2.A. se muestran dos ejemplos de neuronas lesionadas y estimuladas en el mismo núcleo, en la parte superior mostramos un ejemplo de neurona sin respuesta y en la parte inferior una de las pocas neuronas que consideramos con respuestas, puede observarse como la respuesta presente es de menor intensidad a las observadas en los grupos controles figuras 4.2.B (controles ipsilaterales) y 4.2.C (controles contralaterales).

A.



B.



C.

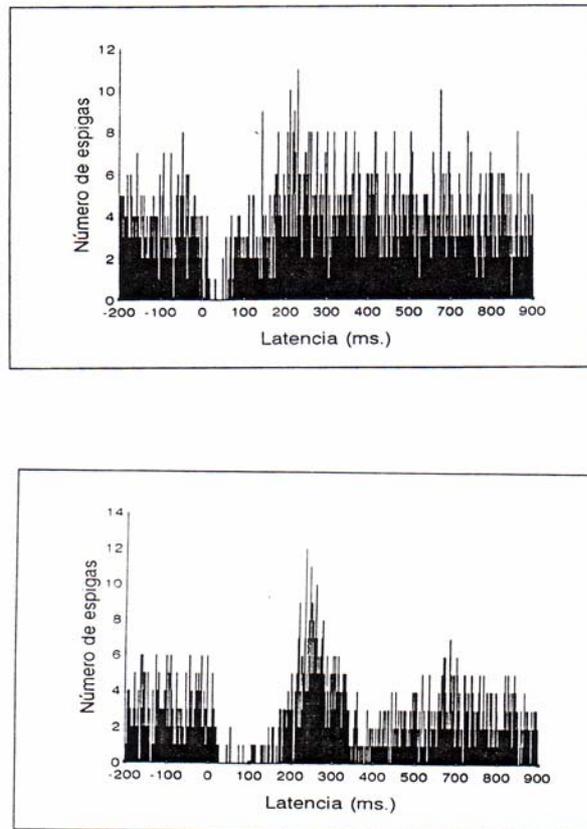
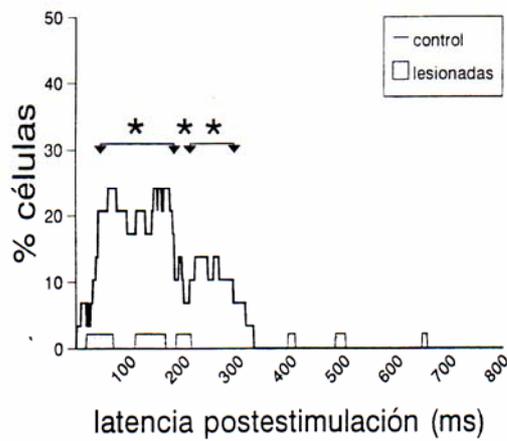
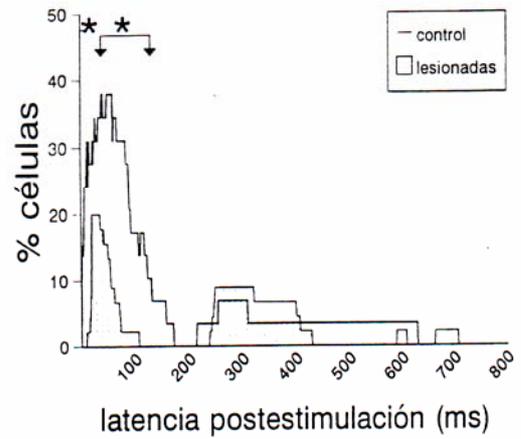


FIGURA 4.2. HTPEs de distintas células catalogadas como dopaminérgicas nigroestriatales. Estos histogramas se obtuvieron al sumarlos PAs registrados en cada ms desde 200 ms antes de cada estimulación del PPN hasta 800 ms transcurridos después de la aplicación de los mismos. (A) Dos ejemplos de células de ratas lesionadas. (B) ejemplos de células del grupo control ipsilateral y (C) del grupo control contralateral.

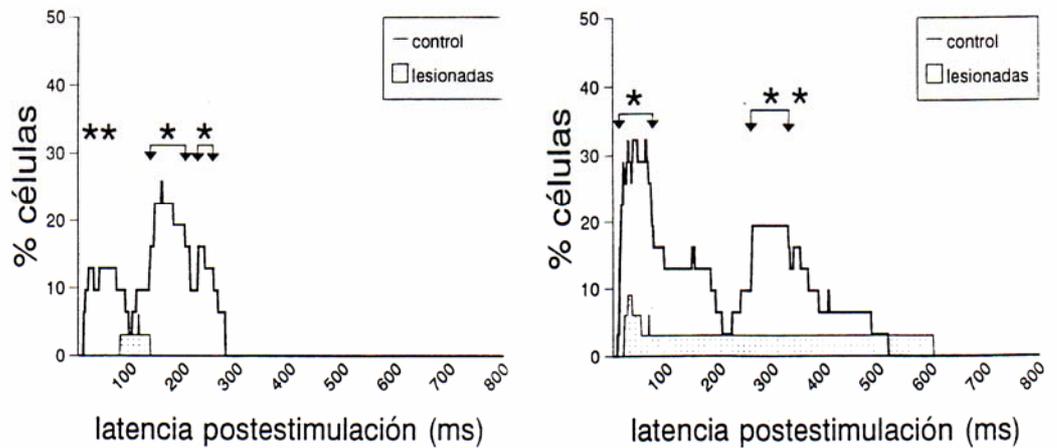
En la figura 4.3 se muestra el efecto de la lesión sobre el porcentaje de células excitadas o inhibidas en intervalos de 1 ms tras la estimulación del PPN ipsi y contralateral comparados con las respuestas de los grupos controles. Se observa como la mayoría de las respuestas disminuyen y hasta desaparecen.



A. Latencia postestimulación de las excitaciones de los grupos control y lesionadas ipsilateral.



B. Latencia postestimulación de las inhibiciones de los grupos control y lesionadas ipsilateral.



C. Latencia postestimulación de las excitaciones de los grupos control y lesionadas contralateral.

D. Latencia postestimulación de las inhibiciones de los grupos control y lesionadas contralateral.

Figura 4.3. Porcentaje de células dopaminérgicas nigroestriatales que se encontraban excitadas o inhibidas en los distintos periodos de 1 ms posteriores a la estimulación del PPN ipsilateral (*= $p < 0,001$ tras la Z).

En la figura 4.4 A y 4.4 B se pueden observar las grandes diferencias entre las distintas características de las respuestas ipsilaterales y contralaterales de los grupos de ratas lesionadas frente a los controles. En la tabla 4.3 se recogen los resultados de la Z al hacer comparación de proporciones entre ellos (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

TABLA 4.3. Test Z de los contrastes de proporciones de las las células NSDA que presentaron respuestas a la estimulación del PPN ipsi- y contralateral en los grupos controles y lesionados en dichos núcleos (*= $p < 0,5$; ** $p < 0,01$). I = grupo de ratas intactas; C = grupo de ratas controles; L = grupo de ratas lesionadas.

| % células | IPSILATERAL | | CONTRALATERAL | |
|---------------------------|-------------|---------|---------------|---------|
| | I - C | C - L | I - C | C - L |
| Con respuesta | -0,25 | 4,53 ** | -0,32 | 4,3 ** |
| Más de 1 respuesta | -0,28 | 4,16 ** | 0,14 | 3,58 ** |
| Al menos 1 inhibición | 0,23 | 3,51 ** | 0,01 | 3,90 ** |
| Al menos 1 excitación | -0,6 | 5,25 ** | 0,23 | 3,65 ** |
| inhibición- excitación | -0,19 | 4,89 ** | 0,09 | 3,36 ** |
| Sólo 1 respuesta | 0,09 | 1,01 | -0,47 | 1,73 * |

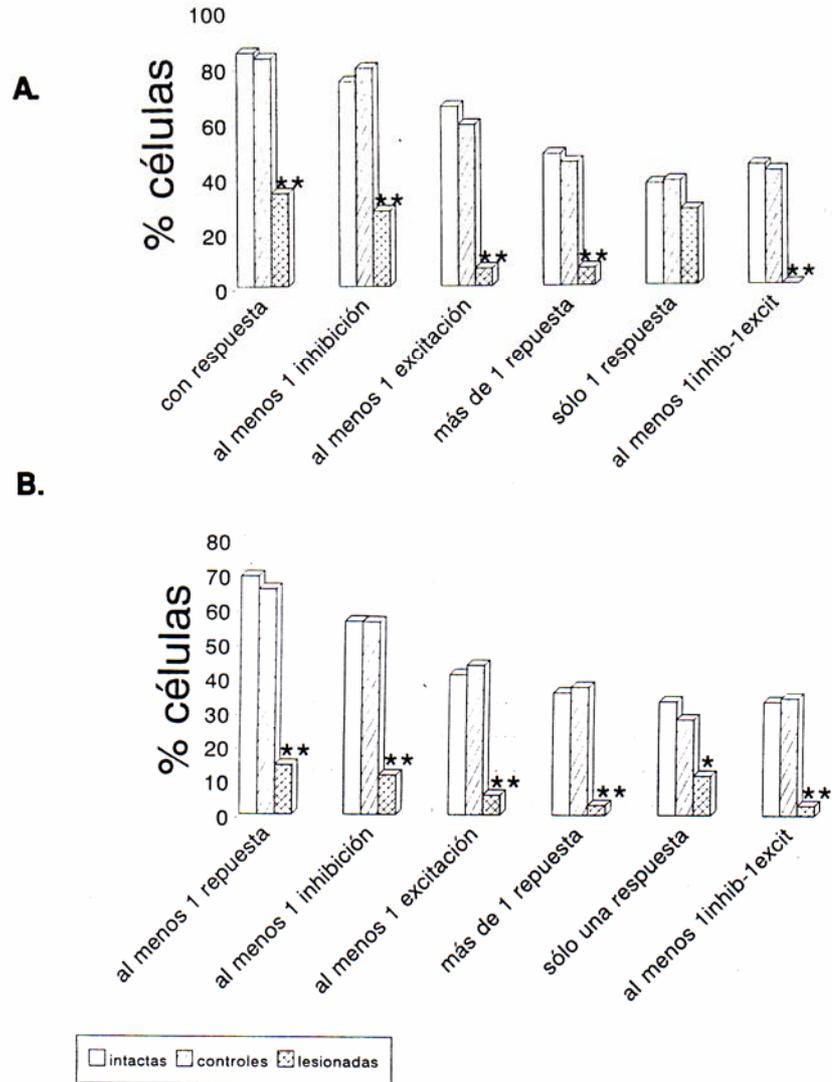


FIGURA 4.4. Porcentaje de células NSDA que mostraron: respuesta, al menos una inhibición como respuesta, al menos una excitación como respuesta, más de una respuesta, sólo una respuesta, al menos una inhibición y una excitación, tras la estimulación del PPN ipsilateral (A) y contralateral (B) (*= $p < 0,5$; ** $p < 0,01$ tras la Z de los contrastes intactas vs controles, controles vs lesionadas).

Para las células que tuvieron respuesta hicimos un estudio de su potencias absoluta y relativa. En cuanto a la potencia absoluta encontramos que tanto en los grupos ipsilaterales como contralaterales, esta potencia se encuentra disminuída en los grupos lesionados con respecto a los grupos controles. Sin embargo, con respecto a la potencia relativa no se alcanzó la significación. Estos resultados se encuentran recogidos en la tabla 4.4. y en la figura 4.5.

TABLA 4.4. *T de Student y probabilidad tras hacer comparación de medias de las potencias absolutas y relativas de los grupos controles vs, lesionados del PPN ipsi y contralateral a las NSDA registradas.*

| POTENCIA ABSOLUTA | | | |
|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|----------------|
| IPSILATERAL | | CONTRALATERAL | |
| Control (24) | Lesionadas (16) | Control (21) | Lesionadas (5) |
| 0,36 ± 0,05 | 0,17 ± 0,04 | 0,58 ± 0,1 | 0,21 ± 0,1 |
| $t_{37,01} = 2,69; p = 0,011 *$ | | $t_{14,40} = 2,53; p = 0,024 *$ | |

| POTENCIA RELATIVA | | | |
|----------------------------|-----------------|----------------------------|----------------|
| IPSILATERAL | | CONTRALATERAL | |
| Control (24) | Lesionadas (16) | Control (21) | Lesionadas (5) |
| 223 ± 0,9 | 111,2 ± 36,94 | 150,52 ± 16,4 | 88,94 ± 18,25 |
| $t_{38} = 1,69; p = 0,099$ | | $t_{23} = 1,79; p = 0,087$ | |

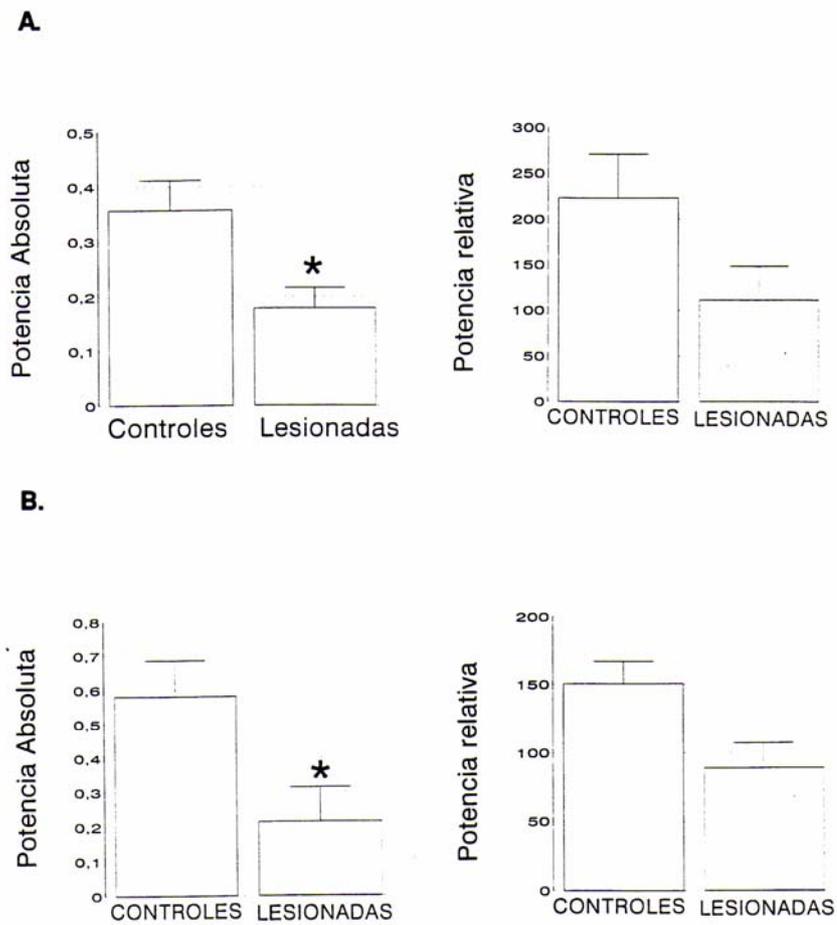


FIGURA 4.5. Potencia absoluta y relativa de los grupos control y lesionadas del PPN ipsilateral(A) y contralateral (B) a las NSDA registradas ($p < 0,05$ tras la T).

4.4 DISCUSIÓN

En el experimento presente, se evidencia claramente que la lesión de las neuronas de la zona del PPN, hace disminuir y en la mayoría de los casos desaparecer, las respuestas de las NSDA a la estimulación eléctrica de la zona del PPN ipsi y contralateral observada en ratas controles. Es decir, podemos concluir que la mayor parte de los efectos observados deben ser debidos a la estimulación de somas neuronales localizados en esta zona y no por estimulación de axones de paso puesto que se ha demostrado repetidamente que el ácido kaínico lesiona somas neuronales más que fibras (Watkins, 1978; Coyle y col., 1978; McGeer y col., 1978) y por otra parte, la lesión inespecífica de las fibras ocasionada directamente por el efecto mecánico de la aguja o por cambios de presión debidos al volumen inyectado, no afecta notablemente al efecto, tal y se concluye al comparar las ratas intactas con las controles.

En los experimentos anteriores, encontramos correlaciones entre los distintos tipos de respuestas y diferentes variables de la actividad electrofisiológica espontánea. Esto podría ser interpretado de dos maneras. Por una parte, podría ocurrir que las neuronas de la zona del PPN estuvieran ejerciendo una influencia tónica sobre la frecuencia y el modelo de descarga de las células A9 pero que nosotros no hayamos podido evidenciar esta acción (no encontramos diferencias en la actividad basal de las A9 antes y durante la estimulación (experimento 2). Esto, tal vez, podría deberse a que nuestra estimulación de 1 HZ sea insuficiente para modificar, de forma significativa, la actividad espontánea de las células del PPN porque represente una frecuencia insuficiente para la actividad espontánea de éstas que oscila entre 0,5 a 8 espigas/s para unas de ellas y entre 10 a 20 espigas/s para otras (Scarnati y col., 1987).

Otra posibilidad podría ser que las neuronas de la zona del PPN que proyectan sobre las NSDA se encontraran estableciendo sinapsis preferencialmente sobre una subpoblación de neuronas NSDA en el caso

de una vía monosináptica o en su caso el circuito polisináptico en función, de su actividad espontánea o algún factor relacionado con ésta.

Este experimento, sugiere que es más probable esta última posibilidad, puesto que en caso contrario la actividad espontánea de las NSDA se debería haber modificado tras la lesión del PPN, a no ser que se hayan producido efectos compensatorios a la lesión. Así, la acción ejercida por el PPN parece ser más fásica que tónica. Esto encajaría con la modificación de la actividad del PPN ante estímulos sensoriales o actividad motora y también con el hecho de que la estimulación del PPN produce tantos potenciales de acción como inhibe, produciendo más bien una corta sincronización de la SN con su actividad.

DISCUSIÓN FINAL

La presente tesis doctoral surgió de la idea de evaluar en que medida la actividad de las neuronas dopaminérgicas nigrales depende de su funcionamiento endógeno y en que medida depende de la actividad de otras zonas del cerebro. Esto es especialmente relevante, teniendo en cuenta que la actividad de las neuronas NSDA en preparaciones en que la sustancia nigra se encuentra desafrentada es diferente de la registrada en animales anestesiados, paralizados o en libre movimiento (Kita y col., 1966; Brodie y Dunwiddie, 1987; Grace, 1987; Shepard y Bunney, 1988). Nuestro conocimiento actual sobre este tema se fundamenta en la actividad endógena en marcapaso, generada por corrientes dependientes de voltaje propias de las neuronas dopaminérgicas (Grace y Bunney, 1984; Shepard y Bunney, 1988; Silva y col., 1990), la liberación dendrítica de dopamina y la activación de autorreceptores (Aghajanian y Bunney, 1973, 1974, 1977), la interacción con otras neuronas nigrales (Grace y Bunney, 1985) y los efectos de las aferencias, especialmente del cuerpo estriado (Dray, 1979; Collingridge y Davies, 1980, 1981; Ryan y col., 1986; Grace y Bunney, 1985) de otros núcleos prosencefálicos (Wassef, Berod y Sotelo, 1981; Smith y Bolam, 1989.1990;Gariano y Groves, 1988;Robledo y Féger, 1990; Smith y Grace, 1992) y del cerebro contralateral (Savaki y col., 1983; Dermon y col., 1990; Castellano y Rodríguez, 1991; Castellano y col., 1993)..

El primer experimento del presente trabajo mostró que las aferencias posteriores, en su globalidad, ejercen un efecto inhibitorio sobre la frecuencia de descarga de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales, puesto que al realizar la hemitransección posterior se observa un aumento de la frecuencia de descarga en la muestra de neuronas dopaminérgicas estudiadas. Este resultado se podría atribuir a la ruptura de las interconexiones entre la sustancia negra y rafe dorsal ya que ésta parece ser la única aferencia conocida del cerebro posterior que ejerce una acción inhibitoria sobre las neuronas dopaminérgicas nigroestriales (Kelland y col., 1991). Así pues, parte del efecto de la hemitransección posterior podría ser atribuido a un efecto serotoninérgico. Se sabe que la vía serotoninérgica procedente del rafe dorsal inhibe a las neuronas dopaminérgicas nigroestriales lentas. Así pues, al desaparecer esta acción (tras la hemitransección posterior a la SN) la distribución de la frecuencia de

descarga de las neuronas dopaminérgicas se ve desplazada hacia la derecha (figura 1.6), aumentando la media de descarga de dichas neuronas. Por otra parte, el primer experimento también mostró que las aferencias anteriores ejercen una acción sobre la regularidad de los intervalos interpotencial (al modificar el CV) sin afectar a la frecuencia de descarga. En cualquier caso, dicho experimento nos indicó que para entender la regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales es necesario contemplar tanto las aferencias anteriores como posteriores y ampliar nuestro conocimiento, que en la actualidad hace mención, casi exclusiva, a las relaciones recíprocas entre el estriado y la sustancia negra.

A pesar de que los resultados del primer experimento sugerían la participación activa del núcleo del rafe, decidimos indagar más en el posible efecto del PPN, especialmente motivados por su relación bilateral con la sustancia negra ya que trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han evidenciado la importancia de vías contralaterales en la regulación de la actividad electrofisiológica de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. En este sentido, la transección de la línea media regulariza la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Castellano y col, 1993) y existe, además, una interrelación funcional entre ambas sustancias negras de modo que la estimulación eléctrica de una sustancia negra modifica la probabilidad de generación de potenciales de acción de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales contralaterales (Castellano y Rodríguez, 1991).

El segundo y tercer experimento mostraron que la modificación de actividad en los núcleos pedúnculo-pontinos ipsi y contralateral tras su estimulación eléctrica, generan un cambio en la descarga de las neuronas dopaminérgicas, observándose en los histogramas periéstímulos respuestas excitatorias e inhibitorias complejas y con diversidad entre células. Asumiendo que bajo el anestésico hidrato de cloral las repuestas excitatorias tempranas descritas en otros trabajos (Scarnati y col., 1984, 1986, 1987; Di Loreto y col., 1992) han sido inhibidas (Kelland y cof., 1990), hemos encontrado respuestas que indican que la acción del PPN sobre la actividad de las neuronas A9 es más compleja y no se limita a respuestas mediadas por vías monosinápticas, sino que también intervienen (según muestran las latencias) vías polisinápticas. Además, estos dos experimentos muestran que el efecto de los núcleos pedúnculo-pontinos ipsi y contralateral son de magnitud similar.

Otro dato importante que se puede extraer de estos experimentos es que a intensidad de las acciones del PPN está relacionada con la actividad espontánea de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Esto sugiere dos posibilidades: a) que las neuronas del PPN estuvieran ejerciendo una influencia tónica sobre la frecuencia y el modelo de descarga de las células del grupo A9 pero que nosotros no hayamos podido evidenciar esta acción debido a que la frecuencia de estimulación que utilizamos (1 HZ) sea insuficiente para modificar significativamente la frecuencia de descarga de las neuronas del PPN y, b) que las neuronas del PPN que proyectan sobre las neuronas NSDA o, en su caso, el circuito polisináptico ejercieran sinapsis preferentemente, sobre una subpoblación de neuronas dopaminérgicas en función de su actividad espontánea o de algún factor relacionado con ésta. El cuarto experimento indica más bien esta posibilidad puesto que en caso contrario, la actividad espontánea de las NSDA se debería de haber modificado tras la lesión del PPN. Así, la acción ejercida por el PPN parece ser más fásica que tónica lo que coincidiría con la modificación de la actividad del PPN ante estímulos sensoriales o actividad motora y también con el hecho de que su estimulación eléctrica produce tantos potenciales de acción como inhibe, sincronizando, de esta manera, a actividad de las NSDA con la suya.

La complejidad de las respuestas encontradas, podían sugerir, no obstante, que parte de esas respuestas no estaban directamente relacionadas con el PPN puesto que podrían haberse estimulado vías ascendentes de paso que modificarían la actividad de las neuronas dopaminérgicas. Por este motivo, consideramos necesario realizar el cuarto experimento y así poder observar si todas las respuestas podían ser atribuidas a las células del PPN. De los resultados obtenidos podemos concluir que las respuestas observadas se resultaron a la estimulación eléctrica de somas de la región del PPN y no a la estimulación de vías de paso. Este último experimento; igualmente, nos permitió observar la inexistencia de acciones tónicas del PPN sobre la frecuencia y modelo de descarga de las neuronas A9.

Tomando en cuenta todos los resultados, consideramos que el PPN no es el responsable de la acción tónica inhibitoria concluida en el experimento 1

puesto que no observamos efectos tras la lesión del PPN sobre la actividad espontánea. Más bien, según los resultados obtenidos por otros laboratorios esta acción inhibitoria parece estar mediada, principalmente, por el rafe. Así pues, parece más razonable concluir que el PPN ejerce más una acción fásica que tónica. Parte de estas acciones se realizarían vía otros núcleos, esto es, mediante vías polisinápticas, mediadas por núcleos relacionados tanto con el PPN como con la nigra. La acción fásica del PPN no generaría cambios notables en la frecuencia de descarga aunque fueran transitorios, puesto que no los hemos detectado, y sí hemos observado que en la población de A9 se generan tanto PA como se inhiben. Más bien, los resultados obtenidos indican que el PPN sincroniza en cierta medida la actividad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales con la suya, modificando el momento de aparición de los potenciales de acción generados intrínsecamente o a aquellos generados por aferencias, de manera similar a lo descrito para la acción del PPN sobre la actividad intrínseca de neuronas talámicas (Steriade y Deschenes, 1984; Steriade y col., 1987), más que modificando significativamente la frecuencia o el modelo de descarga. Si tenemos presente que, al menos, parte de estos efectos se realizan a través de otros núcleos, cabría esperar que esta sincronización se realiza también sobre los núcleos mediadores, generando, posiblemente, una cierta sincronización de los núcleos involucrados en el control de los movimientos.

El núcleo pedúnculo-pontino ha sido estudiado intensamente desde una aproximación neuroanatómica, encontrándose que está conectado recíprocamente con, entre otros, los núcleos de los ganglios basales y además, bilateralmente con la sustancia negra. No obstante, son escasos los estudios relativos a la acción del pedúnculo-pontino sobre dichos núcleos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian que el pedúnculo-pontino es un núcleo con una clara influencia tanto ipsilateral como contralateral sobre las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, por lo tanto, creemos que es fundamental tenerlo en cuenta para poder comprender los distintos procesos así como las diferentes patologías relacionados con los sistemas dopaminérgicos nigroestriatales.

CONCLUSIONES

1. Las aferencias a la sustancia negra procedentes del cerebro anterior actúan sobre el modelo de descarga de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales haciéndolas más irregulares. Así, la hemitransección anterior a la sustancia negra disminuyó el coeficiente de variación de la población de neuronas dopaminérgicas estudiadas.
2. Las aferencias posteriores a la sustancia negra ejercen una acción inhibitoria tónica sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales de manera que la desconexión de la SN de estas aferencias produce un aumento de la frecuencia de descarga en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales al disminuir el número de neuronas con baja frecuencia de descarga.
3. Las respuestas observadas en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales tras la estimulación de la zona de los núcleos pedúnculo-pontinos ipsilateral y contralateral se deben a la estimulación eléctrica de somas y no de vías de paso.
4. La modificación de la actividad de las neuronas del núcleo pedúnculo-pontino tras su estimulación eléctrica condicionan la probabilidad de descarga del sistema nigroestriatal ipsilateral bien disminuyéndola, bien aumentándola o ambos en diferentes períodos postestimulación.
5. La acción de la estimulación eléctrica del núcleo pedúnculo-pontino sobre las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales contralaterales es similar, tanto en el tipo de respuesta como en la magnitud de las mismas, a las obtenidas tras la estimulación del núcleo pedúnculo-pontino ipsilateral.
6. La actividad electrofisiológica de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales condicionan su respuesta a la estimulación eléctrica tanto del del núcleo pedúnculo-pontino ipsilateral como del contralateral.
7. La acción del núcleo pedúnculo-pontino sobre la actividad electrofisiológica de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales parece ser fásica más que tónica ya que la destrucción tanto del núcleo tegmental-pedúnculo-pontino-ipsilateral como la del contralateral no modifica la actividad

espontánea de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales.

8. La zona del cerebro posterior implicada en la regulación de la actividad espontánea de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales no es el núcleo pedúnculo-pontino dado que la destrucción de sus neuronas con ácido kaínico no modifica dicha actividad.

BIBLIOGRAFÍA

- AGHAJANIANN, G.K. y BLOOM, F.E., 1966.
"Electron-microscopic autoradiography of rat hypothalamus after intraventricular (3H) norepinephrine". *Science*, 153: 308-310.
- AGHAJANIAN, G.K. y BUNNEY, B.S., 1973.
"Central dopaminergic neurons: Neurophysiological identification and responses to drugs". En: *Frontiers in Catecholamine Res.*, Snyder, S.H. y Usdin, E., Pergamon Press, New York, pp. 643-648.
- AGHAJANIAN, G.K. y BUNNEY, B.S., 1974.
"Dopaminergic and non-dopaminergic neurons of the substantia nigra: differential responses to putative transmitters". En: *Neuropsychopharmacology*, Boissier, J.R., Hippus, H. y Pichot, D., Excerta Medica, Vol. 359, Elsevier, Amsterdam, pp 444-452.
- AGHAJANIAN, G.K. y BUNNEY, B.S., 1977
"Dopamine "autoreceptors": Pharmacological characterization by microiontophoretic single cell recording studies". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharma-col.* 297: 1-7
- AHLENIUS, S., ENGEL, J., ERIKSSON, H., MIDIGH, K. y SODERSTEN, P., 1972.
"Importance of central catecholamines in the mediation of lordosis behaviour in ovariectomized rats treated with estrogen and inhibitors of monoamine synthesis". *J. Neural Transm.* 33: 247-255.
- AHLENIUS, S., HILLEGAART, V., HJORTHIS, S. y LARSSON, K., 1991.
"Effects of sexual interactions on the in vivo rate of monoamine synthesis in forebrain regions of the male rat". *Behav. Brain Res.* 46: 117-122.
- ALBERT, P.R., NEVE, K.A., BUNZOW, J.R. y CIVELLI, O., 1990. "Coupling of the coned rat dopamine-D2 receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion". *J. biol. Chem.* 265: 2098-2104.
- ALTAR, A., NEVE, K.A., LOUGHLIN, S.E., MARSHALL, J.F. y FALLON, J.F., 1983.

The crossed mesostriatal projection: neurochemistry and developmental response to lesion". *Brain Res.*, 279: 1-8.

ARIANO, M.A. y SIBLEY, D.R., 1994. "Dopamine receptor distribution in the rat CNS: elucidation using anti-peptide antisera directed against D_{1A} and D₃ subtypes". *Brain. Res.*, 649: 59-110.

AMSTRONG, D.M., SAPER, C.B., LEVEY, A.I., WAINER, B.H. AND TERRY, R.D.. 1983
"Distribution of cholinergic neurons in the rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.*, 216: 53-68

ANDERSON, M. y YOSHIDA, M. 1977
"Electrophysiological evidence for branching nigral projections to the thalamus and the superior colliculus". *Brain Res.*, 137: 361-364.

ARÉVALO, R., 1985
"Importancia del precursor tirosina en el desarrollo de los sistemas dopaminérgicos centrales de la rata macho". En: Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, La Laguna.

BATES, M.D., SENOGLES, S.E., BUNZOW, J.R., LIGGETT, S.B., CIVELLI, O. y CARON, M.G., 1991.
"Regulation of responsiveness at D2 dopamine receptor desensitization and adenylyl cyclase sensitization". *Mol. Pharmacol.*, 39: 55-63.

BECHARA, a. y VAN DER KOOY, D., 1989.
"The tegmental pedunculo-pontine nucleus: a brain-stem output of the limbic system critical for the conditioned place preferences produced by morphine and amphetamine". *J. Neurosci.*, 9: 3400-3409.

BECKSTEAD, R. 1979
"An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat". *The J. Comp. Neurol.*, 184: 43-62.

- BECKSTEAD, R.M., 1983.
"Long collateral branches of substantia nigra pars reticulata axons to thalamus, superior colliculus and reticular formation in monkey and cat. Multiple retrograde neuronal labeling with fluorescent dye". *Neuroscience*, 10: 767-779.
- BENKIRANE, S., ARBILLA, S, y LANGER, S.Z., 1987.
"A functional response to D1 dopamine receptor stimulation in the central nervous system: inhibition of the release of [3H]-serotonin from the rat substantia nigra". *Arch. Pharmacol.*, 335: 502-507.
- BENINATO, M. y SPENCER, R.F. 1987.
"A cholinergic projection to the rat substantia nigra from the pedunculopontine tegmental nucleus". *Brain Res.*, 412: 169-174.
- BENINATO, M. y SPENCER, R.F. 1988.
"The cholinergic innervation of the rat substantia nigra: a light and electron microscopic immunohistochemical study". *Exp. Brain Res.*, 72: 178-184.
- BENUCK, M. y REITH, M.E.A., 1992.
"Dopamine releasing effect of phenylbiguanine in rat striatal slices". *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 345: 666-672
- BERTLER, A. y ROSENGREN, E., 1959.
"Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues". *Experientia* 15:10.
- BISCHOFF, S., SCATTON, B. y KORF, J., 1979.
"Biochemical evidence for a transmitter role of dopamine in the rat hippocampus". *Brain Res.*, 165: 161-165.
- BJÖRKLUND, A. y LINDVALL, O., 1975.
"Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons. Suggestions for a role in dendritic terminals". *Brain Res.*, 83: 531-537.
- BOLAM, J.P., FRANCIS, C.M. y HENDERSON, Z., 1991.
"Cholinergic input to the dopaminergic neurons in the substantia nigra: a

double immunocytochemical study". *Neuroscience*, 41: 483-494.

BOWERS, M.B., Jr, 1974.

"Central dopamine turnover in schizophrenic syndromes". *Arch. Gen. Psychiatry*, 31: 50-54

BRENNEMAN, A.R. y KAUFMAN, S., 1964.

"The role of tetrahydropteridines in the enzymatic conversion of tyrosine to 3,4-dihydroxyphenylalanine". *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 17: 177-183.

BRODIE, M.S. y DUNWIDDIE, T.V., 1987.

"Cholecystokinin potentiates dopamine inhibition of mesencephalic dopamine neurons in vitro". *Brain Res.* 425: 106-113

BUBSER, M. y KOSCH, M., 1994.

"Prepulse inhibition of the acoustic startle response of rats is reduced by 6-hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex". *Psychopharmacology*, 113: 487-492.

BUNNEY, B.S., WALTERS, J.R., ROTH, R.H., AGHAJANIAN, G.K., 1973.

"Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity". *J. Pharm. Exp. Ther.*, 185: 560-571.

BUNNEY, B.S. y AGHAJANIAN, G.K., 1976.

"The precise localization of nigral afferents in the rat as determined by a retrograde tracing techniques". *Brain Res.*, 117: 423-446.

BUNNEY, B.S. y GRACE A.A., 1978.

"Acute and chronic haloperidol treatment: Comparison of effects of nigral dopaminergic cell activity". *Life Sciences*, 23: 1715-1728.

BUNNEY, B.S., CHIODO, L.A. y FREEMAN, A.S., 1985.

"Further studies on the specificity of proglumide as a selective cholecystokinin antagonist in the Central Nervous System". En: *Neuronal Cholecystokinin*, Vanderhaegen, J. y Crawley, J.N., *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 448, The New Academy of Sciences, New York, pp.345-351.

- BUNNEY, B.S., 1987.
"Central dopamine-peptide interactions: electrophysiological studies".
Neuropharmacol., 26: 1003-1009.
- BUNZOW, J.R., VAN TL, H.H.M., GRANDY, D.K., ALBERT, P., SALON, J.,
CHISTIE, M., MACHIDA, C.A., NEVE, K.A. y CIVELLI, O., 1988.
"Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor". *Nature* 336: 783-
787.
- CALNE, D.B., 1970.
"Parkinsonism". In: Physiology, Pharmacology and Treatment. London:
Edward Arnold d, Ltd.
- CAMPBELL, K.J. y TAKADA, M., 1989.
"Bilateral tectal projections of the nigrostriatal dopamine cells in the rat".
Neuroscience, 33: 311-321.
- CANTERAS, N.S., SHAMMAH-LAGNADO, S.J., SILVA, B.A. y RICARDO,
J.A., 1990.
"Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde
and anterograde horseradish peroxidase study in the rat". *Brain Res.*, 513:
43-59.
- CARLSSON, A., 1959.
"The ocurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the
nervous systems". *Pharmacol. Rev.*, 11: 490-493.
- CARLSSON, A. y LINDQVIST, M., 1978
"Dependence of 5-HT and catecholamines synthesis on concentrations of
precursos amino-acid in rat brain". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.*
Pharmacol., 303: 157-164.
- CARLSSON, A., 1988
"The current status of the dopamine hypothesis of schizofrenia"
Neuropsychopharmacology., 1: 179-186.
- CARLSSON, M. y SUENSSON, A., 1990.
"The non-competitive NMDA antagonists MK801 and PCP, as well as the

competitive NMDA antagonist SD2-EAA494 (D-CPPene), interact synergistically with clonidine to promote locomotion in monoamine-depleted mice". *Life Sci.*, 47: 1729-1736.

CARTEL, D.A. y FIBIGER, M.A., 1978.

"The projections of the entopeduncular nucleus and globus pallidus in rat as demonstrated by autoradiography and horseradish peroxidase histochemistry". *J. Comp. Neurol.*, 177: 113-124.

CARTER, C.J., 1982.

"Topographical distribution of possible glutamatergic pathways from the frontal cortex to the striatum and substantia nigra in rat".. *Neuropharmacology*, 21: 379-383.

CASTELLANO, M.A. y RODRIGUEZ, M., 1991.

"Nigrostriatal dopaminergic cell activity is under control by substantia nigra of the contralateral brain side: electrophysiological evidence", *Brain Res. Bull.* 27: 213-218.

CASTELLANO, M.A., RIVERO, F.L. y RODRIGUEZ, M., 1993. "Spontaneous firing of nigrostriatal dopaminergic neurons in split-brain rats". *Neurol. Lett.*, 162: 1-4

CHERAMY, A., NIEOULLON, A., MICHELOT, R. y GLOWINSKI, J., 1977.

"Release of dopamine in vivo from cat substantia nigra". *Neurol. Lett.*, 4: 105-109.

CHERAMY, A., LEVIEL, V., DAUDET, F., GUIBERT, B., CHESSELET, M.F. y GLOWINSKI, J., 1981.

"Involvement of thalamus in the reciprocal regulation of the two nigrostriatal dopaminergic pathways". *Neuroscience*, 6: 2657-2668.

CHERAMY, A., LEVIEL, V. y GLOWINSKI, J., 1981.

"Dendritic release of dopamine in the substantia nigra" *Nature*, 289: 537-542.

CHILDS, J.A. y GALE, K., 1984.

"Circling behavior elicited from the pedunculo pontine nucleus: evidence for the involvement of hindbrain GABAergic projections". *Brain Res.*, 304: 387-391.

CHIO, C.L., LAJINESS, M.E. y HUFF, R.M., 1994.

"Activation of heterologously expressed D3 dopamine receptors: comparison with D2 dopamine receptors". *Mol. Pharmacol.* 45: 51-60.

CHIODO, L.A., ANTELMAN, S.M., CAGGIULA, A.R., LINNEBERRY, C.G. 1980.

"Sensory stimuli alter the discharge rate of dopamine (DA) neurons: evidence for two functional types of DA cells in the substantia nigra". *Brain Res.*, 189:544-549.

CHIODO, L.A. y BUNNEY, B.S., 1985.

"Possible mechanisms by which repeated clozapine administration differentially affects the activity of two subpopulations of midbrain dopamine neurons". *J. Neurosci.* , 5: 2539-2544.

CHIODO, L.A. y BUNNEY, B.S., 1987."Population response of midbrain dopaminergic neurons to neuroleptics: Further studies on time course and nondopaminergic neuronal influences". *J. Neurosci.* , 7: 629-633.

CHIODO, L.A., FREEMAN, A.S. y BUNNEY, B.S., 1987.

"Electrophysiological studies on the specificity of the cholecystinin antagonist proglumide". *Brain Res.*, 410: 205-211.

CHIODO, L.A., 1988.

"Dopamine-containing neurons in the mammalian central nervous system: electrophysiology and pharmacology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12: 49-91
CHIODO, L.A. y KAPATOS, G., 1992.

"Membrane properties of identified mesencephalic dopamine neurons in primary dissociated cell culture". *Synapse* 11: 294-309.

CHRISTENSSON-NYLANDER, I., HERRERA-MARSCHITZ, M., STAINES,

HÖKFELT, T., TERENIUS, L., UNGERSTEDT, U., CUELLO, C., OERTEL, W. H. y GOLDSTEIN, M., 1986."Striato-nigral dynorphin and substance P pathways in the rat". *Exp. Brain Res.*, 64: 169-192.

CLARKE, P.B.S., y PERT, A., 1985."Autoradiographic evidence for nicotine receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic neurons". *Brain Res.*, 348: 355-358.

CLARKE, P.B.S., HOMMER, D.W., PERT, A. y SKIRBOLL, L.R., 1985a. "Electrophysiological actions of nicotine on substantia nigra single units". *Brit. J. Pharmacol.*, 85: 827-835.

CLARKE, P.B.S., SCHWARTZ, R.D., PAUL, S.M. y PERT, A., 1985b. "Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of ³H-acetylcholin, ³H-nicotine and ¹²⁵I-alpha-bugarotoxin". *J. Neurosci.*, 5: 1307-1315.

CLARKE, P.B.S., HOMMER, D.W., PERT, A. y SKIRBOLL, L.R., 1987. "Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunclopontine nucleus in the rat: neuroanatomical and electrophysiological evidence". *J. Neurosci.*, 23: 1011-1019.

CLEÑIENTS, J.R. y GRANT, S., 1990. "Glutamate like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunclopontine nuclei in the rat". *Neurosci. Lett.*, 120: 70-73.

COHEN, A.I., TODD, R.D., HARMON, S. y O'MALLEY, K.L., 1992. "Photoreceptors of mouse retinas possess D4 receptors coupled to adenylate cyclase". *Proc.Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 12093-12097

COLLINGRIDGE, G.L. y DAVIES, J., 1979. "Responses of nigral compacta and reticulata neurones to putative inhibitory neurotransmitters and striatal stimulation" *J. Physiol.* 301 41 P

COLLINGRIDGE, G.L., JAMES, T.A. y MACLEOD. N.K., 1979. "Neurochemical and electrophysiological evidence for a projection from the locus coeruleus to the substantia nigra". *J. Physiol.*, 290: 44P.

- COLLINGRIDGE, G.L. y DAVIES, J., 1981.
"The influence of striatal stimulation and putative neurotransmitters on identified neurones in the rat Substantia Nigra". *Brain Res.*, 212: 345-359.
- COLLINGRIDGE, G.L. y DAVIES, J. 1981.
"Neurochemical and electrophysiological evidence for a projection from the locus coeruleus to the substantia nigra". *J. Physiol.*, 290: 44P.
- CORTES, R. y PALACIOS, J.M., 1986.
"Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the rat brain. I. Quantitative autoradiographic studies". *Brain Res.*, 362: 227-238.
- CORTES, R., PROBST, A., TOBLER, H.J. y PALACIOS, J.M., 1986.
"Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the human brain". *Brain Res.*, 362: 239-253.
- CREESE, J. BURT, D.R. y SNYDER. S H. (1977)
"Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity". *Science* 19 7: 596-598
- DAHLSTRÖM, A. y FUXE, K., 1954"Evidence for the existence of monoamine containing neuron in the central nervous system. I.Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons". *Acta Physiol. Scan., [Suppl]*, 62: 1-55.
- DAVID, C., EWERTS, M., SEEBURG, P H. y FUCHS, S. 1991. "Antipeptide antibodies differentiate between long and short isoforms of D₂ receptor". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 824-821.
- DAVIS, K.L., KAHN, R.J., KO, G. y DAVIDSON, M., 1991.
"Dopamine in schizophrenia a review and reconceptualization". *Ann. J. Psychiat.*, 148: 1474-1486.
- DEARRY, A., GINGRICH, J.A., FALARDEAU,P., FREMEAU, R.T., Jr, BATES, M.D. y CARON, M.G., 1990
"Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor". *Nature* 347: 72-76.

- DENIAU, J.M., HAMMOND-LE GUYADER, C., FEGER, J. y MCKENZIE, J.S., 1977.
"Bilateral projection of nigro-collicular neurons: an electrophysiological analysis in the rat". *Neurosci. Lett.*, 5: 45-50.
- DENIAU, J.M., HAMMOND, C., RISZK, A. y FEGER, J., 1978.
"Electrophysiological properties of identified output neurons of the rat substantia nigra (pars compacta and pars reticulata): evidences for the existence of branched neurons". *Exp. Brain Res.*, 32: 409-422
- DENIAU, J.M., THIERRY, A.M. y FEGER, J., 1980.
"Electrophysiological identification of mesencephalic ventromedial tegmental (vmt) neurons projecting to the frontal cortex, septum and nucleus accumbens". *Brain Res.*, 189: 315-326.
- DENIAU, J.M., KITAI, S.T., DONOGHUE, J.P. y GROFOVA, I., 1982.
"Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons" *Exp. Brain Res.*, 47: 105-113.
- DERMON, C.R., PIZARRO, P., GEORGOPOULLOS, P. y SAVAKI, H.J., 1990.
"Bilateral alterations in local cerebral glucose utilization following intranigral application of the GABAergic agonist muscimol". *J. Neurosci.*, 10: 2861-2878.
- DE SARRO, G., MELDRUM, B.S., DE SARRO, A. y PATEL, S., 1992.
"Excitatory neurotransmitters in the lateral habenula and pedunculopontine nucleus of rat modulate limbic seizures induced by pilocarpine". *Brain Res.*, 591: 209-222.
- DEUTCH, A.Y., GOLDSTEIN, M., BALDINO, F.JR. y ROTH, R.H., 1988.
"Telencephalic projections of the A8 dopamine cell group". En: *The mesocorticolimbic dopamine system*, Kalivas, P.W. y Nemeroff, C.B., Annals of the New York Academy of Sciences, The New York Academy of Sciences Vol. 537, New York, pp. 27-50.
- DIANA, M., GARCIA-MUNOZ, M., RICHARDS, J., y FREED, C.R., 1989.

"Electrophysiological analysis of dopamine cells from the substantia nigra pars compacta of circling rats". *Exp. Brain Res., Lett.*, 74: 625-630

DI LORETO, S., FLORIO, T., SCARNATI, E. 1992.

"Evidence that non-NMDA receptors are involved in the excitatory pathway from the pedunculo-pontine region to nigrostriatal dopaminergic neurons". *Exp. Brain Res., Lett.*, 89: 79-86.

DOMESICK, V., 1988.

"Neuroanatomical organization of dopamine neurons in the ventral tegmental area". En: *The mesocorticolimbic dopamine system*, Kalivas, P.W. y Nemeroff, C.B, *Annals of the New York Academy of Sciences*, The New York Academy of Sciences Vol. 537, New York, pp. 1-26.

DOUGLAS, R., KELLAWAY, L., MINTZ, M. y VAN WAGENINGEN, G., 1987. "The crossed nigrostriatal projection decussates in the ventral tegmental decussation". *Brain Res.*, 418: 111-121.

DRAY, A., GONYE, T.J., OAKLEY, N.R. 1976.

"Caudate stimulation and substantia nigra activity in the rat". *J. Physiol.*, 259: 825-849.

DRAY, A., 1979.

"The striatum and substantia nigra: a commentary on their relationships". *Neuroscience*, 4: 1407-1439.

DUNCAN, R.J.S. y SOUKES, T.L., 1978.

"Enzymes involved in catecholamine metabolism: tyrosine hydroxylase, aromatic amino acid decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase, phenylethanolamine N-methyltransferase, catechol o-methyltransferase, aldehyde dehydrogenase, and alcohol dehydrogenase". En: *Res. Methods in Neurochemistry*, Marks, N. y Rodnight, R., Plenum Press, Vol. 4, New York-London, pp. 145-176.

EDVARDSEN, O. y DAHL, S.G., 1994

"A putative model of dopamine transporter". *Mol. Brain Res.*, 27: 265-274.

-
- EHRINGER, H. y HORNYKIEWICZ, O., 1960.
"Dopamin (3-hydroxyturamine) im gehirn des menschen und ihr verhalten bei erkrankungen des extrapyramidalen systems". *Klin Wochenschr*, 38: 1236-1239.
- EINHORN, L.C., GREGERSON, K.A., y OXFORD, G.S., 1991.
"D2 dopamine receptor activation of potassium channels in identified rat lactrophs: whole-cell and single-channel recording". *J. Neurosci.*, 11: 3727-3737
- FARNEBO, L.O. y HAMBERGER, B., 1971.
"Drug-induced changes in the release of 3H-monoamines from field stimulated rat brain slices". *Acta Physiol. Scan.*, [Suppl], 371: 35-44.
- FALLON, J.M. y MOORE, R.Y., 1978.
"Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum". *J. Comp. Neurol.*, 180: 545-580.
- FALLON, J.H. y LOUGHLIN, S.E., 1982.
"Monoamine innervation of the forebrain: collateralization". *Brain Res. Bull.*, 9: 295-307.
- FALLON, J.H., 1988.
"Topographic organization of ascending dopaminergic projections. En: The mesocorticolimbic dopamine system, Kalivas, P.W. y Nemeroff, C.B, *Annals of the New York Academy of Sciences, The New York Academy of Sciences Vo1.537, New York, pp. 1-9.*
- FASS, B. y BUTCHER, L.L., 1981.
"Evidence for a crossed nigrostriatal pathway in rats". *Neurosci. Lett.*, 22: 109-113.
- FAULL, R.L.M. y MEHLER, W.R., 1978.
"The cells of origin of nigrotectal, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat". *Neuroscience*, 3: 989-1002.

-
- FIBIGER, H.C., y SEMBA, K., 1988.
"Afferent connections of the pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei in the rat". *Neurosci., Abstr.*, 14: 633.
- FICALORA, A.S. y MIZE, R.R., 1989.
"The neurons of the substantia nigra and zona incerta which project to the cat superior colliculus are GABA immunoreactive: a double-label study using GABA immunocytochemistry and lectin retrograde transport". *Neuroscience*, 29: 567-581.
- FREEMAN, A.S., MELTZER, L.T. y BUNNEY, B.S., 1985.
"Firing properties of substantia nigra dopaminergic neurons in freely moving rats". *Life Sciences*, 36: 1983-1994.
- FREEMAN, A.S. y BUNNEY, B.S. 1987.
"Activity A9 and A10 dopaminergic neurons in unrestrained rats: further characterization and effects of apomorphine and cholecystinin". *Brain Res.*, 405: 46-55.
- FREMEAU, R.J., DUNCAN, G.E., FORNARETTO, M.G., DEARRY, A., GINGRICH, J.A., BREESE, G.R. y CARON, M.G., 1991.
"Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission". *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3772-3776.
- FULLER, J.H. y SCHLAG, J.D., 1978.
"Determination of antidromic excitation by the collision test: problems of interpretation". *Brain Res.*, 112: 283-298.
- FUXE, K., 1965.
"Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system". *Acta Physiol. Scan.*, [Suppl], 247: 39-85.
- FUXE, K., HÖKFELT, T., AGNATI, L.F., JOHANNSON, O., GOLDSTEIN, M., PÉREZ DE LA MORA, M., POSSANI, L., TAPIA, R., TERAN, L. y PALACIOS, R., 1978.

"Mapping out central catecholamine neurons: immunohistochemical studies on catecholamine-synthesizing enzymes". En: *Psychopharmacology: a generation of progress*, Lipton, M.A., DiMascio, A. y Killam, S.F., Raven Press, New York, pp. 67-94.

GANDELMAN, K.Y. HARMON, S. TODD, R.D. Y O'MALLEY, K.L., 1991.
"Analysis of the structure and expression of the human dopamine D_{2A} receptor gene". *J. Neurochem.* 56: 1024-1029.

GARCÍA-RILL, E., SKINNER, R.D., JACKSON, M.B. y SMITH, M.M., 1983a. "Connections of the mesencephalic locomotor region (MLR) I. Substantia nigra afferents". *Brain Res. BuA.*, 10: 57-62.

GARCÍA-RILL, E., SKINNER, R.D., GILMORE, S.A. y OWINGS, R., 1983b. "Connections of the mesencephalic locomotor region (MLR) II. Afferents and efferents". *Brain Res. Bull* 10: 63-71.

GARCÍA-RILL, E., 1983c
."Connections of the mesencephalic locomotor region (MLR) III. Intracellular recording". *Brain Res. Bull.*, 10: 73-81.

GARCÍA-RILL, E., SKINNER, R.D. y FITZGERALD, J.A., 1983d.
"Activity in the mesencephalic locomotor region during locomotion". *Exp. Neurol.*, 82: 609-622.

GARIANO, R.F. y GROVES, P.M., 1988. "Burst firing in midbrain anterior cingulate cortices". *Brain Res.*, 462: 194-198.

GERFEN, L.B., JESSELL, T.M., CUELLO, A.C. y IVERSEN, L.L., 1976.
"Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra" *Nature* 260: 258-260.

GERFEN, C.R., STAINES, W.A., ARBUTHNOTT, G.W. y FIBIGER, H.C., 1982.
"Crossed connections of the substantia nigra in the rat". *J. Comp. Neurol.*, 207: 283-303.

GERFEN, C.R., ENGBER, T.M., MAHAN, L.C., SUSEL, Z., CHASE, T.N., MONSMA, F.J., Jr y SIBLEY, D.R., 1990.

- "D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons". *Science.*, 250: 1429-1432.
- GIBSON, C.J., DEIKEL, S.M., YOUNG, S.N. y BINIK, Y.M., 1982.
"Behavioral and biochemical effects of tryptophan, tyrosine and phenylalanine in mice". *Psychopharmacology*, 76: 118-121.
- GIROS, B., MARTRES, M.P., SOKOLOFF, P. y SCHWARTZ, J.C., 1990.
"Gene cloning of human dopaminergic D3 receptor and identification of its chromosome". *C.R. Acad. Sci. III.* 311: 501-508.
- GLICK, S.D., CRANE, A.M., JERUSSI, T.P., FLEISHER, L.N. y GREEN, J.P., 1975.
"Functional and neurochemical correlates of potentiation of striatal asymmetry by callosal section". *Nature*, 254: 616-617.
- GLICK, S.D., ROSS, D.A. y HOUGH, L.B., 1982.
"Lateral asymmetry of neurotransmitters in human brain". *Brain Res.*, 234: 53-63.
- GLOWINSKI, J. e IVERSEN, L.L., 1966.
"Regional studies of catecholamines in the rat brain II1. Subcellular distribution of endogenous and exogenous catecholamines in various brain regions". *Bioch. Pharmacol.*, 15: 977-987.
- GOLSMITH, M. y VAN DER KOOY, D., 1988.
"Separate noncholinergic descending projections and cholinergic ascending projections from the nucleus tegmenti pedunculo-pontinus". *Brain Res.*, 445: 386-391.
- GOLDSTEIN, M. y DEUTCH, A.Y., 1992.
"Dopaminergic mechanism in the pathogenesis of schizophrenia". *FASEB J.*, 6: 2413-2421.
- GONON, F.G. y BUDA, M.J. 1985.

"Regulation of dopamine release by impulse flow and by autoreceptors as studied by in vivo voltammetry in the rat striatum". *Neuroscience*, 14: 765-774.

GONON, F.G., SUAUD-CHAGNY, M.F., MERMET, C.C., BUDA, M. 1991. "Relation between impulse flow and extracellular catecholamine levels as studied by in vivo electrochemistry in CNS". En Volume Transmission in the brain: Novel Mechanism for Neural Transmission, edited by K. Fuxe and L.F. Agnati. Raven Press, Ltd., New York.

GONZALEZ, M.C., DIAZ-PALAREA, M.D., ARÉVALO, R., CASTRO, R. y RODRIGUEZ, M., 1986.

"Different role of incertohypothalamic and nigrostriatal dopaminergic systems in the thermoregulatory response of the rat". *Life Sci.*, 39: 707-716.

GOULD, E. W., OOLF, N.J., BUTCHER, L.L. 1989.

"Cholinergic projections to the substantia nigra from the pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei". *Neuroscience*, 28: 611-623.

GRACE, A.A. y BUNNEY, B.S., 1979.

"Paradoxical gaba excitation of nigral dopaminergic cells: indirect mediation through reticulata inhibitory neurons". *Eur J. Pharmacol.*, 59: 211-218.

GRACE, A.A. y BUNNEY, B.S. , 1980.

"Nigral dopamine neurons: intracellular recording and identification with L-Dopa injection and histofluorescence". *Science*, 210: 654-656.

GRACE, A.A., HOMMER, D.W. Y BUNNEY, B.S., 1980.

"Peripheral and striatal influences on nigral dopamine cells: mediation by reticulata neurons". *Brain Res. Bull.*, 5: 105-109.

GRACE, A.A. y BUNNEY, B.S., 1983a.

Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons-1: Identification and characterization. *Neuroscience*, 10: 301-315

GRACE, A.A. y BUNNEY, B.S., 1983b.

Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic

neurons-2: Action potential generating mechanism and morphological correlates. *Neuroscience*, 10: 317-331.

GRACE, A.A. y BUNNEY, B.S., 1984a.
"The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single firing". *J. Neurosci.*, 11: 2866-2876.

GRACE, A.A. y BUNNEY, B.S., 1984b.
"The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing". *J. Neurosci.*, 11: 2877-2890

GRACE, A.A., 1985.
"Dopamine". En: Neurotransmitter actions in the vertebrate nervous system, Rogawski, M.A. y Barker, J.L., Plenum Publishing Corp. pp. 285-319.

GRACE, A.A. y BUNNEY, B.S. 1985.
"Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell activity". *Brain Res.*, 333: 271-284

GRACE, A.A., 1987.
"The regulation of dopamine neuron activity as determined by in vivo and in vitro intracellular recordings". En: Neurophysiology of dopaminergic systems. Current status and clinical perspectives, Chiodo, L.A. y Freeman, A.S., Lakeshore Publishing Company, Grosse Pointe, pp. 1-66.

GRACE, A.A., 1991.
"Phasic versus tonic dopamine release and modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the role of dopamine in schizophrenia". *Neuroscience*, 41: 1-24

GRACE, A.A., 1992.
"The depolarization block hypothesis of neuroleptic action: implication for the etiology and treatment of schizophrenia". *J. Neural Transm.*, 36 (suppl.): 91-131.

GRACE, A.A., 1993
"Cortical regulation of subcortical dopamine systems and its possible

relevance to schizophrenia". *J. Neurol. Transm.*, 91: 111-134

GRANATA, A.R. y KITAI, S.T., 1989.

"Intracellular analysis of excitatory subthalamic inputs to the pedunculopontine neurons". *Brain Res.*, 488: 57-72.

GRANDY, D.Q., ZHANG, Y.A., BOUVIER, C., ZHOU, Q.Y., JOHNSON, R.A., ALLEN, L., BUCK, K., BUNZOW, J.R., SALON, J. Y CIVELLI, O., 1991. "Multiple human D_S dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes". *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9175-9179

GRAYBIEL, A.M. 1977.

"Direct and indirect preoculomotor pathways of the Brainstem: an autoradiographic study of the pontine reticular formation in the cat". *J. Comp. Neurol.* , 175: 37-78.

GRAYBIEL, A., 1978.

"Organization of the nigrotectal connection: an experimental tracer study in the cat". *Brain Res.*, 143: 339-348.

GRAYBIEL, A.M. y RAGSDALE, C., 1983.

"Biochemical anatomy of striatum". En: *Chemical Neuroanatomy*, Emson, P.C., Raven Press, New York, pp. 427-501.

GROFOVÁ, I., 1975.

"The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. And experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish". *Brain Res.*, 91: 286-291.

GROFOVA, I., OTTERSEN, O.P. y RINVIK, E., 1978.

"Mesencephalic and diencephalic afferents to the superior colliculus and periaqueductal gray substance demonstrated by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in the cat". *Brain Res.*, 146: 205-220.

GROFOVA, I., DENIAU, J.M. y KITAI, S.T. 1982.

"Morphology of the substantia nigra pars reticulata projection neurons intracellularly labeled with HRP". *J. Comp. Neurol.*, 208: 352-368

- GROVES, P.M., WILSON, C.J., YOUNG, S.J., REBEC, G.V. 1975. "Self-inhibition by dopaminergic neurons". *Science*, 190: 522-529
- GROVES P.M., y LINDER, J.C., 1983.
"Dendro-dendritic synapses in Substantia Nigra: Descriptions based on analysis of serial sections". *Expe. Brain Res.*, 49: 209-217.
- GUYENET, P.G. y AGHAJANIAN, G.K., 1978.
"Antridomic identification of dopaminergic and other output neurons of rat substantia nigra". *Brain Res.* 150: 69-84
- GUYENET, P.G. y CRANE, J.K., 1981.
"Non dopaminergic nigrostriatal pathway". *Brain Res.*, 213: 291-305.
- HAJÓS, M., y GREENFIELDS. S.A., 1993.
"Topographic heterogeneity of substantia nigra neurons: diversity in intrinsic membrane properties and synaptic inputs". *Neuroscience* 55: 919-934.
- HALÁSZ, N., LJUNGDAHL, A, H~KFELT, T., JOHANSSON, O., GOLDSTEIN, M., PARK, D. y BIBERFELD, D., 1977. "Transmitter-histochemistry of the rat olfactory bulb. I. Immunohistochemical localization of monoamine synthesizing enzymes : support for intrabulbar, periglomerular dopamine neurons". *Brain Res.*, 126: 455-474.
- HALLANGER, A.E. y WAINER, B.H., 1988.
"Ascending projections from the pedunculopontine tegmental nucleus and the adjacent mesopontine tegmentum in the rat". *J. Comp. Neurol.*, 274: 483-515.
- HALLIDAY, G.M., LI, Y.W., BLUMBERGS, P.C., JOH, T.H. COTTON, R.G., HOWE, P.R., BLESSING, W.W. y GEFFEN, L.B., 1990.
"Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease". *Ann. Neurol.*, 27: 373-385.
- HANTLEY, G.W., MORRINSON, J.H., PRIKHOZHAN, A. Y SEALFON, S.C., 1992
"Localization of multiple dopamine receptor subtype motor cortex and

striatum". *Brain Res.*, 15: 181-188

HATTORI, F., FIBIGER, H.C. y MCGEER, P.L., 1975.

"Demonstration of a pallido-nigral projection innervating dopaminergic neurons". *J. Comp. Neurol.*, 162: 487-504.

HAYES, G., BIDEN, T.J., SELBIE, L.A. y SHINE, J., 1992.

"Structural subtypes of the dopamine D2 receptor are functionally distinct: expression of the cloned D2A and D2B subtypes in a heterologous cell line". *Mol. Endocrin.*, 6: 920-926.

HENDERSON, Z. y GREENFIELD, S.A., 1987.

"Does the substantia nigra have a cholinergic innervation?". *Neurosci. Lett.*, 73: 109-113.

HENDERSON, Z. y SHERRIF, F.E., 1991.

"Distribution of choline acetyltransferase immunoreactive axons and terminals in the rat and ferret brainstem". *J. Comp. Neurol.*, 314: 147-163.

HERKENHAM, M., 1979.

"The afferent and efferent connections of the ventromedial thalamic nucleus in the rat". *J. Comp. Neurol.*, 183: 487-518.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.L.G-A., MARTÍNEZ-FONG, D., ROSALES, M.G. y ACEVES, J., 1994.

"Cholinergic stimulation of rostral and caudal substantia nigra pars compacta produces opposite effects on circling behavior and striatal dopamine release measured by brain microdialysis". *Neuroscience*, 62, 2: 441-447

HERY, F., SOUBRIE, P., BOURGOIN, S., MOTASTRUC, J.L., ARTAUD, F. y GLOWINSKI, J., 1980.

"Dopamine released from dendrites in the substantia nigra controls the nigral and striatal release of serotonin". *Brain Res.*, 193: 143-151.

HIRSCH, E.C., GRAYBIEL, A.M., DUYSKAERTS, C. y JAVOY-AGID, F., 1987.

"Neural loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson disease

and in the progressive supranuclear palsy". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 5976- 5980.

HÖKFELT, T., SKIRBOLL, L., REHFELD, J.F., GOLDSTEIN, M., MARKEY, K. y DANN, O., 1980.

"A subpopulation of mesencephalic dopamine neurons projecting to limbic areas contains a cholecystinin-like peptide: evidence from immunohistochemistry combined with retrograde tracing". *Neuroscience*, 5: 2093-2124.

HOMMER, D.W. y BUNNEY, B.S. 1980.

"Effect of sensory stimuli on the activity of dopaminergic neurons: Involvement of non-dopaminergic nigral neurons and striato-nigral pathways". *Life Sciences*, 27: 377-386.

HOMMER, D.W. y SKIRBOLL, L., 1983.

"Cholecystinin-like peptides potentiate apomorphine-induced inhibition of dopamine neurons". *Eur J Pharmacol.* 91: 151-152.

HOMMER, D.W., STONER, G., CRAWLEY, J.N., PAUL, S.M. y SKIRBOLL, L.R., 1986.

"Cholecystinin-dopamine coexistence: electrophysiological actions corresponding to cholecystinin receptor subtype". *J. Neurosci.*, 6: 3039-3043.

HORNYKIEWICZ, O., 1960.

"Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function". *Pharmacol. Rev.*, 18: 925-964.

HORNYKIEWICZ, O., 1978.

"Psychopharmacological implications of dopamine and dopamine antagonists: A critical evaluation of current evidence". *Neuroscience*, 3: 773-783.

HOUNSGAARD, J., NEDERGAARD, S. y GREENFIELD, S.A., 1992.

"Electrophysiological localization of distinct calcium potentials at selective somatodendritic sites in the substantia nigra". *Neuroscience*. 50: 513-518.

-
- IKEDA, M., FAHIEN, L.A. y UDEFRIEND, S.. 1966."A kinetic study of bovine adrenal tyrosine hydroxylase". *J. Biol. Chem.*, 241: 4452-4456.
- INGLIS, W.L., DUNBAR, J.S. y WINN, P., 1994.
"Outflow from the nucleus accumbens to the pedunclopontine tegmental nucleus: A dissociation between locomotor activity and the acquisition of responding for conditioned reinforcement stimulated by d-amphetamine". *Neuroscience*, 62, 1: 51-64.
- INNIS, R.B., ANDRADE, R. y AGHAJANIAN, G.K., 1985
"Substance K excites dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat substantia nigra". *Brain Res.*, 335: 381-383.
- ISHII, K. y KATO, T. ,1985.
"Increase of dopamine turnover in bilateral striata after unilateral injection of haloperidol into substantia nigra of unrestrained rats". *Brain Res.*, 359: 260266.
- ISHIKAWA, K., OTT, T. y MCGAUGH, J.L., 1982.
"Evidence for dopamine as a transmitter in dorsal hippocampus". *Brain Res.*, 232: 222-226.
- JACKSON, A. y CROSSMAN, A.R., 1981.
"Basal ganglia and other afferent projections to the peribrainachial region in the rat: a study using retrograde and anterograde transport of horseradish peroxidase". *Neuroscience*, 6: 1537-1549.
- JACKSON, A. y CROSSMAN, A.R., 1983.
"Nucleus tegmenti pedunclopontinus: efferent connections with special reference to the basal ganglia studied in the rat by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase". *Neurosci. Lett*, 10 725-765.
- JACKSON, Q.H. Y WESTLIND-DANIELSSON, A.. 1994.
"Dopamine receptors: Molecular biology, biochemistry and behavioral aspects". *Pharmac. Ther.*, 64: 291-369

- JACOBS, H.M. III, y COX, B.M., 1992.
"Serotonin-stimulated release of [3H]dopamine via reversal of the dopamine transporter in rat striatum and nucleus accumbens: a comparison with release elicited by potassium, N-methyl-D-aspartic acid, glutamic acid and Damphetamine". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 356-364.
- JELLINGER, K., 1988.
"The pedunculo-pontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 51: 540-543.
- JELLINGER, K., 1991.
"Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway". *Mol. Chem. Neuropathol.* , 14: 153-197.
- JIMENEZ-CASTELLANOS, J. y GRABYEL. A.M.. 1987.
"Subdivisions of the primate substantia nigra pars compacta detected by acetylcholinesterase histochemistry". *Brain Res.* 437: 349-354.
- JURASKA, J.M., WILSON, C.J. y GROVES, P.M., 1977.
"The Substantia Nigra of the rat: A Golgi study" *J. Comp. Neurol.*, 172: 585-600
- KANG, Y., y KITAI, S.T., 1990.
"Electrophysiological properties of pedunculo-pontine neurons and their postsynaptic responses following stimulation of substantia nigra reticulata". *Brain Res.* 535: 79-95
- KANTERMAN, R.Y., MAHAN, L.C., BRINLEY, E.M., MONSMA, F.J., SIBLEY, D.R., AXELROD, J. y FELDER, C.C., 1991
"Transfected D2 dopamine receptors mediate the potentiation of arachidonic acid release in Chinese hamster ovary cells" *Mol. Pharm.*, 39: 364-369.
- KARSON, C.N., GARCÍA-RILL, E., BIEDERMANN, J., MRAK, R.E., HUSAIN, M.M. y SKINNER, R.D., 1991
"The brain stem reticular formation in schizophrenia". *Psychiatry Res.*, 40: 31-48.

-
- KEBABIAN, J.W. y CALNE, D.B., 1979.
"Multiple receptors for dopamine". *Nature*, 277: 93-96.
- KELLAND, M.D. y ASDOURIAN, D., 1989.
"Pedunculo pontine tegmental nucleus-induced inhibition of muscle activity in the rat". *Behav. Brain Res.*, 34: 213-234.
- KELLAND, M.D., CHIODO, L.A. y FREEMAN, A.S. 1990.
"Use of ketamine in electrophysiological studies of midbrain dopamine neurons". In: Domino, E.F., ed. *Status of Ketamine in anesthesiology*. Ann Arbor: NPP Books, 181-191.
- KELLAND, M.D., FREEMAN, A.S. y CHIODO, L.A. 1991.
"Serotonergic afferent regulation of the basic physiology and pharmacological responsiveness of nigrostriatal dopamine neurons". *J. Pharm. Exp. Th.* 253: 803-811
- KELLAND, M.D., FREEMAN, A.S., RUBIN, J. y CHIODO, L.A. 1993.
"Ascending afferent regulation of rat midbrain dopamine neurons". *Brain Res. Bull.*, 31: 539-546.
- KELLY, E., JENNER, P. y MARSDEN, C.D., 1985.
"The effects of dopamine and dopamine agonists on the release of H-GABA and H-5HT from rat nigral slices". *Bioch. Pharmacol.*, 34: 2655-2662.
- KILPATRICK, I.C. y STARR, M.S., 1981.
"The nucleus tegmenti pedunculo pontinus and circling behaviour in the rat". *Neurosci. Lett.*, 26: 11-16.
- KILPATRICK, I.C., COLLINGRIDGE, G.L. y STARR, M.S., 1982.
"Evidence for the participation of nigrostriatal -aminobutyrate-containing neurones in striatal and nigral-derived circling in the rat". *Neuroscience*, 7: 207-222.
- KITA T., KITA, H, KITAI, T., 1986.
"Electrical membrane properties of rat substantia nigra compacta neurons in an in vitro slice preparation". *Brain Res.*, 372: 21

-
- KORF, J., ZIELEMAN, M. y WESTERINK, B.H.C., 1976.
"Dopamine release in substantia nigra". *Nature*, 260: 257-258.
- KRUEGER, B.K., 1990."Kinetics and block of dopamine uptake in synaptosomes from rat caudate nucleus". *J. Neurochem.*, 55: 260-267.
- KUCZENSKI, R., 1983."Biochemical action of amphetamine and other stimulants". In *Stimulants: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives*, edited by I. Creese. New York: Raven p. 31-61.
- LACEY, M.G., CALABRESI, P. y NORTH, R.A., 1990.
"Muscarinic depolarizes rat substantia nigra zona compacta and ventral tegmental neurons in vitro through M1-like receptors". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 253: 395-400.
- LAMBAS-SEÑAS, L., CHAMBA, G., DENNIS, T., RENAUD, B. y SCATTON, B., 1985.
"Distribution of dopamine, noradrenaline and adrenaline in coronal sections of the rat lower Brainstem". *Brain Res.*, 347: 306-312.
- LAVIN, A. y GARCÍA-MUÑOZ, M., 1985.
"Electrophysiological changes in substantia nigra after dynorphin administration". *Brain Res.*, 369: 298-302.
- LAUTERBORN, J.C., ISACKSON, P.J., MONTALVO, R. y GALL, C.M., 1993. "*In situ* hybridization localization of choline acetyltransferase mRNA in adults rat brain and spinal cord". *Mol. Brain Res.*, 17: 59-69.
- LEE, J.M., MCLEAN, S., MAGGIO, J.E., ZAMIR, N., ROTH, R.H., ESKAY, R.L. y BANNON, M.J., 1986.
"The localization and characterization of substance P and substance K in striatonigral neurons". *Brain Res.*, 371: 152-154.
- LEE, H.J., RYE, D.B., HALLANGER, A.E., LEVEY, A.I., WAINER, B.H. 1988. "Cholinergic vs. noncholinergic efferents from the mesopontine tegmentum to

- the extrapyramidal motor system nuclei". *J. Comp. Neurol.* 275: 469-492.
- LE MOINE, C., NORMAND, E. y BLOCH, B., 1991.
"Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D, dopamine receptor gene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4205-4209
- LEONARD, C.S. y LLINÁS, R., 1988.
"Electrophysiology thalamic-projecting cholinergic brainstem neurons and their inhibition by ACH". *Soc. Neurosci., Abstr.*, 14:297.
- LEVIEL, V., CHÉRAMY, A. y GLOWINSKI, J., 1979.
"Role of the dendritic release of dopamine in the reciprocal control of the two nigro-striatal dopaminergic pathways". *Nature*, 280: 236-239.
- LICHENSTEIGER, W., HEFTI, F., FELIX, D., HUWYLER, T., MELAMED, E. y SCHLUMPF, M., 1982.
"Stimulation of nigrostriatal neurones by nicotine" *Neuropharmacology*, 21: 963-968.
- LINDVALL, O. y BJORKLUND, A., 1983.
"Dopamine- and norepinephrine- containing neuron systems: their anatomy in the rat Brain". En: *Chemical Neuroanatomy*, Emson, P.C, Raven Press, New York, pp. 229-255.
- LIPSKI, J., 1981.
"Antidromic activation of neurones as an analytical tool in the study of the central nervous system". *J. Neurosci. Meth.* 4:1-32.
- LIVINGSTON, M.S. y HUBEL, D.H., 1981.
"Effects of sleep and arousal on the processing of visual information in the cat". *Nature*, 291: 554-561.
- LIU, Y.F., CIVELLI, O., GRANDY, D.K. y ALBERT, P.R., 1992
"Differential sensitivity of the short and long human dopamine D2 receptor subtypes to protein kinase". *C.J. Neurochem.* 59: 2311-2317.
- LLINAS, R., GREENFIELD, S.A. y JAHNSEN, H., 1984.

- "Electrophysiology of pars compacta cells in the vitro substantia nigra- a possible mechanism for dendritic release". *Brain Res.*, 294: 127-132.
- LLOYD, T. y WEINER, N., 1971.
"Isolation and characterization of a tyrosine hdroxylase cofactor from bovine adrenal medulla". *Mol. Pharm.*, 7: 569-580.
- MAHALIK, T.J., 1988.
"Direct demonstration of interactions between substance P immunoreactive neurons in the Substantia Nigra of the rat: an ultrastructural study". *Synapse*, 2: 508-515.
- MANSOUR, A., MEADOR, W.J., BUNZOW, J.R., CIVELLI, O., AKIL, H. y WATSON, S.J., 1990.
"Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat Brain and pituitary an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis" *J.Neurosci* 10 2587-2600
- MARCINKIEWICZ, M., VERGE, D., GOZLAN, H., PICHAT, L. y HAMMON, M., 1984.
"Autoradiographic evidence for heterogeneity of 5HT1 site in the rat Brain". *Brain Res.*, 291: 159-163.
- MARTINEZ-MURILLO, R., VILLALBA, R.M., MONTERO-CABALLERO, M.I. y RODRIGO, J., 1989.
"Cholinergic somata and terminals in the rat substantia nigra: an immunocytochemical study with optical and electron microscopic techniques". *J. Comp. Neurol.*, 281: 397-416.
- MASH, D.C. y POTTER, L.T., 1986.
"Autoradiographic localization of M₁ and M₂ muscarine receptors in the rat brain". *Neuroscience*, 19: 551-564.
- MASSERANO, J.M., VULLIET, P.R., TANK, A.W. y WEINER, N., 1989.
"The role of tyrosine hydroxylase in the regulation of catecholamines synthesis". En: *Catecholamines II*, Trendelenburg, U. y Weiner, N., SpringerVerlag, Berlín, pp. 427-469.

McELVAIN, J.S. y SCHENK, J.O., 1992. "A multisubstrate mechanism of striatal dopamine uptake and its inhibition by cocaine". *Biochem. Pharmacol.*, 43: 2189-2199.

McGEER, E.G. y McGEER P.L., 1984
"Substantia nigra cell death from kainic acid or folic acid injection into the pontine tegmentum". *Brain Res.*, 298: 339-342.

McVITIE, L.D., ARIANO, M.A. y SIBLEY, D.R., 1991
"Characterization of anti-peptide antibodies for the localization of D₂ dopamine receptors in rat striatum". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1441-1445.

MEADOR-WOODRUFF, J.H., MANZOM, A., VAN TOL, H.H.M., WATSON, S.J. Jr. y CIVELLI, O., 1989.
"Distribution of D₂ dopamine receptor mRNA in rat brain". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 7625-7628.

MELIS, R.M., ARGIOLAS, A., 1995.
"Dopamine and sexual behavior". *Neurosci. Biobehav. Res.*, 19: 19-38.

MELTZER, H.Y., 1988.
"New insights into schizophrenia through atypical antipsychotic drugs". *Neuropsychopharmacology*, 1: 193-196.

MENGOD, G., VILARÓ, M.T., NIZNIK, H.B., SUNAHARA, R.K., SEEMAN, P., O'DOWD, B.F. y PALACIOS, J.M., 1991
"Visualization of a dopamine D₁ receptor mRNA in human and rat Brain". *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 10: 185-191.

MESULAM, M.M., MUFSON, E.J., WAIMER, B.H. y LEVEY, A.I., 1983.
"Central cholinergic pathway in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6)". *Neuroscience*, 10: 1185-1201.

MILLER, J.D., SANGHERA, M.K. y GERMAN, D.C., 1981.
"Mesencephalic dopaminergic unit activity in the behaviorally conditioned rat". *Life Sciences*, 29: 1255-1263.

-
- MILLS, A., ALLET, B., CHABERT, C., BRAINANDT, E., CAVEGN, C., CHOLLET, A. y KAWASHIMA, E., 1993.
"Expression and characterization of human D4 dopamine receptors in baculovirus-infected insect cells". Fed. Eur. Biochem. Soc., 320: 130-134.
- MINTZ, I., HAMMOND, C., GUIBERT, B. y LEVIEL, V., 1986.
"Stimulation of the subthalamic nucleus enhances the release of dopamine in the rat substantia nigra". Brain Res., 376: 406-408.
- MONSMA, F.J., MAHAN, L.C., McVITTIE, L.D., GERFEN, C.R. y SIBLEY, D.R., 1990.
"Molecular cloning and expression of D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation". Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 87: 6723-6727.
- MOON-EDLEY, S. AND GRAYBIEL, A.M. 1983.
"The efferent and afferent connections of the feline nucleus tegmenti pedunculopontinus, pars compacta". J. Comp. Neurol. 217: 187-215
- MOORE, R.Y., 1978.
"Catecholamine innervation of basal ganglia. I. The septal area". J. Comp. Neurol., 177: 665-684.
- MOORE, R.Y. y BLOOM, F.E., 1978.
"Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of dopamine system". Ann, Rev. Neurosci., 2: 129-169.
- MOORE, R.Y., HALARIS, A.E. y JONES, B.E., 1978.
"Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections". J. Comp. Neurol., 180: 417-438.
- MORIIZUMI, T., NAKAMURA, Y., TOKUNO, H., KITAO, y KUDO, M., 1988.
"Topographic projections from the basal ganglia to the nucleus tegmenti pedunculopontinus pars compacta of the cat with especial reference to pallidal projections". Exp. Brain Res., Lett., 71: 298-306.
- MORIIZUMI, T. y HATTORI, T., 1992.
"Separate neural populations of the rat globus pallidus projecting to the

subthalamic nucleus, auditory cortex and pedunculo-pontine- tegmental area". *Neuroscience*, 46: 701-710.

MULDER, A.H., VAN DEN BERG, W.B. y STOOF, J.C., 1975. "Calcium-dependent release of radiolabelled catecholamines and serotonin from rat Brain synaptosomes in a superfusion system". *Brain Res.*, 99: 419-424.

MURRIN, L.C., MORGENROTH, V.H. y ROTH, R.H., 1976. "Dopaminergic neurons: effects of electrical stimulation on tyrosine hydroxylase". *Mol. Pharmacol.*, 12: 1070-1081.

NAEFF, B., SCHLUMPF, M. y LICHTENSIGER, W., 1992. "Pre- and postnatal development of high-affinity ³H-nicotine binding sites in rat brain regions, an autoradiographic study" *Brain Res. Dev.* 68: 163-174.

NAGATSU, T., LEVITT, P. y UDENFRIEND, S., 1954. "Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis". *J. Biol. Chem.*, 238: 2910-2917

NAKAMURA, Y., TOKUNO, H., MORIIZUMI, T., KITAO, Y. y KUDO, M., 1989. "Monosynaptic nigral inputs to the pedunculo-pontine tegmental nucleus neurons which send their axons to the medial reticular formation in the medulla oblongata. An electron microscopic study in the cat". *Neurosci. Lett.*, 103: 145-150.

NAUTA, H.J.W. y COLE, M., 1978. "Efferent projections of the subthalamic nucleus: an autoradiographic study in monkey and cat". *J. Comp. Neurol.*, 180: 1-16.

NEDERGAARD, S. y GREENFIELD, S.A., 1989. "A possible ionic basis for dendritic release of dopamine in the guinea-pig substantia nigra". *Acta Physiol. Scand.*, 135: 67-68.

NEDERGAARD, S. y GREENFIELD, S.A., 1992. "Sub-populations of pars compacta neurons in the substantia nigra: the

significance of qualitatively and quantitatively distinct conductances". *Neuroscience* 48: 423-437.

NEVE, K.A., NEVE, R.L., FIDEL, S., JANOWSKY, A. y HIGGINS, G.A., 1991
"Increased abundance of alternatively spliced forms of D2 dopamine receptor mRNA after denervation". *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 2802-2806.

NIEOULLON, A., CHÉRAMY, A. y GLOWINSKI, J., 1977a.

"Release of dopamine in vivo from cat substantia nigra". *Nature*, 266: 375377.

NIEOULLON, A., CHÉRAMY, A. y GLOWINSKI, J., 1977b.

"Interdependence of the nigrostriatal dopaminergic systems on the two sides of the Brain in the cat" *Science*. 198 416-418

NIEOULLON, A., CHERAF~1Y. A., LEVIEL. V. y GLOWINSKI, J., 1979.
"Effects of the unilateral nigral application of dopaminergic drugs on the in vivo release of dopamine drugs of dopamine in two caudate nuclei of the cat". *Eur. J. Pharmacol.*, 53: 289-296.

NOMURA, S.. MIZUNO, M. AND SUGIMOTO, T. 1980."Direct projections from the pedunculopontine tegmental nucleus to the subthalamic nucleus in the cat". *Brain Res.*, 196: 223-227

NURSE, B., RUSELL,V.A. y TALJAARD J.J.F., 1988.

"Characterization of the effects of serotonin on the release of [3H]dopamine from rat nucleus accumbens and striatal slices". *Neurochem. Res.*, 13: 403407.

OERTEL, W.H., TAPPAZ, M.L., BEROD, A. y MUGNAINI, E., 1982. "Two-color immunohistochemistry for Dopamine and Gaba neurons in rat Substantia Nigra and Zona Incerta". *Brain Res. Bull.*, 9: 463-474.

OERTEL, W.H. y MUGNAINI, E., 1984.

"Immunocytochemical studies of gabaergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems". *Neurosci. Lett.*, 47: 233-238.

- OLMSTEAD, M.C. y FRANKLIN, K.B.J., 1994.
"Lesions of pedunculo-pontine tegmental nucleus abolish catalepsy and locomotor depression induced by morphine". *Brain Res.*, 662: 134-140.
- OLSON, L., SELGER, A. y FUXE, K., 1972.
"Heterogeneity of striatal and limbic dopamine innervation: highly fluorescent islands in developing and adult rats". *Brain Res.*, 44: 283-288
- , L., SEIGER, A. y FUXE, K., 1992.
"Heterogeneity of striatal and limbic dopamine innervation: Highly fluorescent island in developing and adult rats". *Brain Res.*, 44: 283-288.
- O'MALLEY, K.L., MACK, K.J., GANDELMAN, K.Y. y TODD, R.D., 1990.
"Organization and expression of the rat D2A receptor gene: identification of alternative transcripts and a variant donor splice site". *Biochemistry*, 29: 1367-1371.
- PALACIOS, J.M. y PAZOS. A.. 1987.
"Visualization of dopamine receptors a progress review" In : Dopamine receptors, pp. 175-197, Creese. I an~ F~aser C M. [eds.] Alan R. Liss., New York.
- PALKOVITS, M., BRAINOWNSTEIN, M.J. y ZAMIR, N., 1984.
"On the origin of dynorphin A and neoendorphin in the substantia nigra". *Neuropeptides*, 4: 193-199.
- PALKOVITS, M. y BROWNSTEIN, M J 1989.
"Catecholamines in the central nervous system". En: Catecholamines II, Trendelenburg, U. y Weiner, N., Springer-Verlag, Berlín, pp. 1-26.
- PARE D., SMITH, Y., PARENT, A.. STERIADE. M . 1988.
"Projections of brainstem core cholinergic and non-cholinergic neurons of cat to intralaminar and reticular thalamic nuclei" *Neuroscience*, 25: 69-86.
- PARE, D., HAZRATI, L.N., PARENT, A. y STERIADE, M., 1990.
"Substantia nigra pars reticulata projects to the reticular thalamic nucleus of

the cat: a morphological and electrophysiological study". *Brain Res.*, 535: 139-146.

PARENT, A. y DE BELLEFEUILLE, L., 1983.
"The pallidointralaminar and pallidonigral projections in primates as studied by retrograde double-labeling method". *Brain Res.*, 27: 11-27.

PARKER, E.M. y CUBEDDU, L.X., 1986.
"Effects of d-amphetamine and dopamine synthesis inhibitors on dopamine and acetylcholine neurotransmission in the striatum. I. Release in the absence of vesicular transmitter stores". *J. Pharm. Exp. Thr.*, 237: 179-192.

PAZOS, A. y PALACIOS, J.M. 1985.
"Quantitative Autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat Brain. I. Serotonin-1 receptors". *Brain Res.*, 346: 205-230.

PAXINOS, G. y WATSON, C. 1986.
"The rat Brain in the stereotaxic coordinates". 2nd edn. Academic Press, New York.

PINNOCK, R.D., 1984.
"Hyperpolarizing action of baclofen on neurons in the rat substantia nigra slice". *Brain Res.*, 332 334-340.

PHILLIPSON, O.T., EMSON, P.C., HORN, A.S. y JESSELL, T., 1977.
"Evidence concerning the anatomical location of the dopamine stimulated adenylate cyclase in the substantia nigra". *Brain Res.*, 136: 45-58.

REID, M., HERRERA-MARSCHITZ, M., HÖKFELT, T., TERENIUS, L. y UNGERSTEDT, U., 1988.
"Differential modulation of striatal dopamine release by intranigral injection of -aminobutyric acid (GABA), dynorphin A and substance P" *Eur. J. Pharm.*, 147: 411-420.

REID, M.S., HERRERA-MARSCHITZ, M., HÖKFELT, T., LINDEFORS, N., PERSSON, H. y UNGERSTEDT, U., 1990a.
"Striatonigral Gaba, dynorphin, substance P and neurokinin A modulation of

nigrostriatal dopamine release: evidence for direct regulatory mechanisms". *Exp. Brain Res., Lett.*, 82: 293-303.

REID, M.S., H~KFELT, T., HERRERA-MARSCHITZ, M., HAKANSON, R., FENG, D.M., FOLKERS, K., GOLDSTEIN, M. y UNGERSTEDT, U., 1990b. "Intranigral substance P stimulation of striatal dopamine release is inhibited by Spantide II: a new tachykinin antagonist without apparent neurotoxicity". *Brain Res.*, 532: 175-181.

REID, M.S., O'CONNOR, W.T., HERRERA-MARSCHITZ, M. y UNGERSTEDT, U., 1990c.

"The effects of intranigral GABA and dynorphin A injections on striatal dopamine and GABA release: evidence that dopamine provides inhibitory regulation of striatal GABA neurons via D2 receptors". *Brain Res.*, 519: 255-260.

REUBI, J.C., IVERSEN, L.L. y JESSELL, T.M., 1977.

"Dopamine selectively increases 3H-GABA release from slices of rat substantia nigra in vitro". *Nature*, 268: 652-654.

REYNOLDS, G.P., 1992

"Developments in the drug treatment of schizophrenia". *Trends. Pharmac. Sci.*, 13: 116-121.

RIBAK, C.E., VAUGHN, J.E. y ROBERTS, E., 1980.

"Gabaergic nerve terminals decrease in the Substantia Nigra following hemitransections of the striatonigral and pallidonigral pathways". *Brain Res.*, 192: 413-420.

RICARDO, J.A., 1980. "Efferent connections of the subthalamic region in the rat. I. The subthalamic nucleus of Luys". *Brain Res.*, 202: 257-271.

RICHARDS, J.G. y TRANZER, J.P., 1970.

"The ultrastructural localization of amine storage sites in the central nervous system with the aid of a specific marker 5-hydroxydopamine". *Brain Res.*, 17: 463-469.

RICHTER, J.A., BARE, D.J., YU, H., GHETTI, B. y SIMON, J.R., 1995.
"Dopamine transporter-dependent and -independent endogenous dopamine release from weaver mouse striatum in vitro". J. Neurochem. 64, 1: 191-198.

RIEDER, P., LANGE, K.W., KORNHUBER, J. y DANIELCZYK, W., 1992
"Glutamatergic-dopaminergic balance in the brain: its importance in motor disorder and schizophrenia". *Arzheim-Forsch.*, 42: 265-268

RINAUDO, M.S., MONSMA, F.J., BLACK, L.E., MAHAN, L.C. y SIBLEY, D.R., 1990.
"Expression and characterization of D2 dopamine receptor isoforms in transfected mammalian cell lines". *Soc. Neurosci. Abstr.*, 16: 209

RINVIK, E., GROFOVA, I. y OTTERSEN, O.P., 1976.
"Demonstration of nigrotectal and nigroreticular projection in the cat by axonal transport of proteins". *Brain Res.* 112: 388-394.

RITZ, M.C., LAMB, R.J., GOLDBERG S.R. y KUHAR, M.J., 1987. "Cocaine receptors on dopamine transporters are related to selfadministration of cocaine". *Science.* 237: 1219-1223.

ROBJNSON, T.E. y BERRIDGE, K.C., 1993.
"The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction". *Brain Res. Rev.* 18: 247-291.

ROBLEDO, P. y FEGER, J., 1990.
"Excitatory influence of rat subthalamic nucleus to substantia nigra pars reticulata and the pallidal complex: electrophysiological data". *Brain Res.*, 518: 47-54.

RODRÍGUEZ, M., CASTRO, R., HERNÁNDEZ, G., MAS, M., 1984.
"Different roles of catecholaminergic and serotonergic neurons of the medial forebrain bundle on male rats sexual behaviour". *Physiol. Behav.*, 33: 5-11.

RODRÍGUEZ, M., CASTELLANO, M.A. y PALAREA, M.D., 1990.
"Interhemispheric regulation of dopaminergic ascending systems". *Life Sci.*,

47: 377-384.

ROMO, R. y SCHULTZ, W., 1990.

"Dopamine neurons of the monkey midbrain: Contingencies of responses to active touch during self-initiated arm movements". *J. Neurophysiol.* 63,3: 592-606.

ROSSER, M.P., KOZLOWSKI, M.R., NEVE, R.L. y NEVE, K.A., 1992.

"Effects of D2 and D3 receptor activation measured by microphysiometry". *Soc. Neurosci. Abstr.* 18: 1171.

ROYCE, G.J., 1978.

"Cells of origin of subcortical afferents to the caudate nucleus: a horseradish peroxidase study in the cat" *Brain Res.* 153: 465-475.

RUFFIEUX, A. y SCHULTZ, W., 1980.

"Dopaminergic activation of reticular neurons in the substantia nigra". *Nature*, 285: 240-241

RUGG, E.L., DUNBAR, J.S., LATIMER, M. y WINN, P., 1992.

"Excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus of the rat. I. Comparison of the effects of various excitotoxins, with particular reference to the loss of immunohistochemically identified cholinergic neurons". *Brain Res.*, 589: 181-193.

RYAN, L.J., YOUNG, S.J. y GROVES, . 1986.

"Substantia nigra stimulation evoked antidromic responses in rat neostriatum". *Exp. Brain Res., Lett.*, 63: 483-528

RYE, D.B., SAPER, C.B., LEE, R.J. y WAINER, B.H. 1987

"Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum". *J. Comp. Neurol.* 252: 483-528

RYE, D.B., LEE, H.J., SAPER, C.B. y WAINER, B.H.. 1988.

"Medullary and spinal afferents of the pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent mesopontine tegmentum in the rat" *J. Comp. Neurol.*, 269:

315-341.

SAPER, C. y LOEWY, A.D., 1982.

"Projections of the pedunclopontine tegmental nucleus in the rat: evidence for additional extrapyramidal circuitry". *Brain Res.* 252: 367-372

SAVAKI, H.E., DESBAN, M., GLOWINSKI, J. y BESSON, M.J., 1983.
"Local cerebral glucose consumption in the rat. II: Effects of unilateral substantia nigra stimulation in conscious and halothane anaesthetized animals." *J. Comp. Neurol.*, 213: 46-65.

SCALLY, M.C., ULUS, I. y WURTMAN, R.J., 1977.

"Brain tyrosine level controls striatal dopamine synthesis in haloperidol treated rats". *J. Neural Transm.*, 41: 1-6.

SCARNATI, E., CAMPANA, E. y PACCITI, C., 1984. "Pedunclopontine-evoked excitation of substantia nigra neurons in the rat". *Brain Res.*, 304: 351-361.

SCARNATI, E., PROIA, A., CAMPANA, E. y PACCITI, C., 1986.

"A microiontophoretic study on the nature of the putative synaptic neurotransmitter involved in the pedunclopontine-substantia nigra pars compacta excitatory pathway of the rat". *Exp. Brain Res., Lett.*, 62: 470-478.

SCARNATI, E., PROIA, A., Di LORETO, S. y PACCITI, C., 1987a.

"The reciprocal electrophysiological influence between the nucleus tegmenti pedunclopontinus and substantia nigra in normal and decorticated rats" *Brain Res.*, 423: 116-124.

SCARNATI, E., PROIA, A., Di LORETO, S. y PACCITI, C., 1987b.

"The organization of nucleus tegmenti pedunclopontinus neurons projecting to basal ganglia and thalamus: a retrograde fluorescent double labeling study in the rat". *Neurosci. Lett.*, 79: 11-16.

SCARNATI, E., HAJDU, F., PACCITI, C. y TOMBOL, T. 1988.

"An EM and Golgi study on the connection between the nucleus tegmenti pedunclopontinus and the pars compacta of the substantia nigra in the rat

J. Hirnforsch., 29: 95-105.

SCATTON, B., SIMON, H., LEMOAL, M. y BISCHOFF, S., 1980.
"Origin of dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation".
Neurosci. Lett., 18: 125-131.

SAKAI, K., LUPPI, P.H., SALVERT, D., KIMURA, H., MAEDA, T. y
JOUVENT, M., 1986.
"Localization of cholinergic neurons in the cat lower brain stem". *C. R.
Acad. Sci. III*, 303: 317-324.

SANGHERA, M.K., TRULSON, M.E. y GERMAN, D.C., 1984.
"Electrophysiological properties of mouse dopamine neurons: in vivo and
in vitro studies". *Neuroscience*, 12: 793-801.

SATO, K. y FIBIGER, H.C., 1985.
"Distribution of central cholinergic neurons in the baboon (*Papio papio*).
II. A topographic atlas correlated with catecholamine neurons". *J Comp.
Neurol.*, 236: 215-233.

SAVAKI, H.E., DESBAN, M., GLOWINSKI, J. y BENSON, H.J., 1983.
"Local cerebral glucose consumption in the rat. II. Effects of unilateral
substantia nigra stimulation in conscious and halthane anesthetized
animals". *J. Comp. Neurol.*, 213: 46-65.

SCHEEL-KRUGER, J, 1991
"The Mesolimbic Dopamine System: From motivation to action" (Ed.)
John Wiley, New York.

SCHMIED, L., PHERMSANGNGAM, P., LEE, H., THIO S. CHEN.
E., TRUONG, P., COLTON, E. y FALLON, J., 1989.
"Collateralization and GAD immunoreactivity of descending pallidal
efferents" *Brain Res.*, 487: 131-142.

SCHMIDT C.J. y BLACK C.K., 1989
"The putative 5-HT₃ agonist phenylbiguanide induces carrier-mediated
release of [³H]-dopamine". *Eur J. Pharmacol.*, 167: 309-310.

-
- SCHULTZ, W y ROMO, R., 1990.
"Dopamine neurons of the monkey midbrain: Contingencies of responses to stimuli eliciting immediate behavioral reactions". *J. Neurophysiol.*, 63,3, 607-624
- SCHWARTZ, R.D., 1986.
"Autoradiographic distribution of high affinity muscarinic and nicotinic cholinergic receptors labeled with ³H acetylcholine in the rat brain" *Life Sci.*, 38: 2111-2119.
- SEEMAN, P., 1980.
"Brain dopamine receptors". *Pharmacol. Rev.*, 32: 229-313.
- SEMBA, K. y FIBIGER, H.C., 1992.
"Afferent connections of the laterodorsal tegmental nuclei in the rat: a retrograde transport and immunohistochemical study". *J. Comp. Neurol.*, 267: 433-453.
- SHEPARD, P.D. y BUNNEY, B.S., 1988.
"Effects of apamin on the discharge properties of putative dopamine-containing neurons in vitro". *Brain Res.*, 463: 380-384.
- SHEPARD, P.D. y BUNNEY, B.S., 1991.
"Repetitive firing properties of putative dopamine-containing neurons in vitro: regulation by an apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ conductance". *Exp. Brain Res., Lett.*, 86: 141-150.
- SHEPARD, P.D. y GERMAN, D.C., 1988a.
"Effects of apamin on the discharge properties of putative dopamine-containing neurons in vitro". *Brain Res.*, 463: 380-384.
- SHEPARD, P.D. y GERMAN, D.C., 1988b.
"Electrophysiological and pharmacological evidence for the existence of distinct subpopulations of nigrostriatal dopaminergic neuron in the rat". *Neuroscience*, 27: 537-546.
- SILVA, N.L. y BUNNEY, B.S., 1986.

- "Electrophysiological properties of dopamine-sensitive neurons in substantia nigra tissue slices". *Soc. Neurosci. Abstr.*, 12: 1517.
- SILVA, N.L., PECHURA, C.M., BARKER, J.L., 1990.
"Postnatal rat nigrostriatal dopaminergic neurons exhibit five types of potassium conductances". *J. Neurophysiol.*, 64,1: 262-272.
- SKIRBOLL, L.R., GRACE, A.A. y BUNNEY, B.S., 1979.
"Dopamine auto- and postsynaptic receptors: electrophysiological evidence for differential sensitivity to dopamine agonists". *Science*, 206: 80-82.
- SKIRBOLL, L.R., GRACE, A.A., HOMMER, D.W., REHFELD, J., GOLDSTEIN, M., HÖKFELT, T. y BUNNEY, B.S., 1981. "Peptide-monoamine coexistence: studies of the actions of cholecystokinin like peptide on the electrical activity of midbrain dopamine neurons". *Neuroscience*, 6: 2111-2124
- SKIRBOLL, L.R. y HOMMER, D.W., 1985.
"Electrophysiological studies of the role of cholecystokinin in the substantia nigra and its interactions with dopamine". En: *Neuronal Cholecystokinin*, Vanderhaegen, J. y Crawley, J.N., Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 448, The New Academy of Sciences, New York, pp.275-282.
- SKAGERBERG, G. y LINDVALL, O., 1985.
"Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat". *Brain Res.*, 342: 340-351.
- SKAGERBERG, G., BJORKLUND, A., LINDVALL, O. y SCHMIDT, R.H. . 1982.
"Origin and termination of the diencephalo-spinal dopamine system in the rat". *Brain Res. Bull.*, 9: 237-244.
- SMITH, G.C, y FINK, G., 1975."Experimental studies on the origin of monoamine-containing fibres in the hypothalamo-hypophyseal complex of the rat". *Brain Res* 43: 37-51.
- SMITH, G.P. y SCHNEIDER, L.H., 1988.

-
- "Relationships between mesolimbic dopamine function and eating behavior". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 537: 254-261.
- SMITH, I.D. y GRACE, A.A. 1992.
"Role of the subthalamic nucleus in the regulation of nigral dopamine neuron activity". *Synapse*, 12: 287-303
- SMITH, Y. y BOLAM, J.P., 1989.
"Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat". *Brain Res.*, 493: 160-167.
- SMITH, Y. y BOLAM, J.P., 1990.
"The output neurones and the dopaminergic neurons of the Substantia Nigra receive a gaba-containing input from the globus pallidus in the rat". *J. Comp. Neurol.*, 296: 47-64
- SNYDER, S.H., 1972.
"Catecholamines in the Brain are mediators of amphetamine psychosis". *Arch. Gen. Psychiatry.* 27: 169-179.
- SNYDER, S.H., BANERJEE, S.P., YAMAMURA, H.I. y GREENBERG, D., 1974.
"Drugs, neurotransmitters and schizophrenia". *Science*, 1984: 1243-1253.
- SNYDER, L.A., ROBERTS, J.L. y SEALFON, S.C., 1991.
"Distribution of dopamine D2 receptor mRNA splice variants in the rat by solution hybridization protection assay". *Neurosci. Lett.*, 122: 37-40.
- SOFRONIEW, M.V., PRIESTLY, J.M., CONSOLAZIONE, A. ECKENSTEIN F y CUELLO, A.C., 1985.
"Cholinergic projections from the midbrain and pons to the thalamus in the rat, identified by combined retrograde tracing and choline acetyltransferase immunohistochemistry". *Brain Res.*, 329: 213-323
- SOKOLOFF, P., GIROS, B., MARTRES, M.P., BOUTHENET, M.L. y SCHWARTZ, J.C., 1990.

"Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics". *Nature*, 347: 146-151.

SMITH, Y. y PARENT, A., 1988.

"Neurons of the subthalamic nucleus in primates display glutamate but not GABA immunoreactivity". *Brain Res.*, 453: 353-356.

SOMOGYI, P., BOLAM, J.P. y SMITH, A.D., 1981.

"Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the Golgi-peroxidase transport-degeneration procedure". *J. Comp. Neurol.*, 195: 567-584.

SOTELO, C., 1975.

"Radioautography as a tool for the study of putative neurotransmitters in the nervous system". *J. Neur Transm [Suppl]*. 12 75-95

SPANN, B.M. y GROFOVA, Y., 1992.

"Cholinergic and non-cholinergic neurons in the rat pedunculopontine tegmental nucleus" *Anat. Embryol.*, 186: 215-227

STAINES, W.A. y FIBIGER, H.C., 1984.

"Collateral projections of neurons of the rat globus pallidus to the striatum and substantia nigra". *Exp. Brain Res., Lett.*, 56: 217-220.

STANDAERT, D.G., SAPER, C.B., RYE, D.B. y WAINER, B.H., 1986.

Colocalization of atriopeptin-like immunoreactivity with choline acetyltransferase and substance p-like immunoreactivity in the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei in the rat". *Brain Res.*, 382: 163-168.

STECKLER, T., INGIS, W., WINN, P. y SAHGAL, A., 1994.

"The pedunculopontine tegmental nucleus: a role in cognitive processes?". 19: 298-318.

STEINDLER, D.A. y DENIAU, J.M., 1980.

"Anatomical evidence for collateral branching of substantia nigra neurons:

a combined horseradish peroxidase and [³H]wheat germ agglutinin axonal transport study in the rat". *Brain Res.*, 196: 228-236.

STERIADE, M. y DESCHENES, M., 1984.
"The thalamus as neural oscillator". *Brain Res. Rev.* 8:1-63.

STERIADE, M., DOMINICH, L., DAKSON, G. y DESCHENES, M., 1987.
"The deafferented reticularis thalami nucleus generates spindle rhythmicity". *J Neurophysiol.*, 57: 260-273.

STOOF, J.C. y KEBABIAN, J.W., 1984.
"Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology". *Life Sci.*, 35: 2281-2296.

STEINFELS, G.F., HEYM, J. y JACOBS, B.L., 1981.
"Single unit activity of dopaminergic neurons in freely moving cats". *Life Sci.*, 29: 1435-1442.

STEININGER, T.L., RYE, D.B. y WAINER, B.H., 1992.
"Afferent projections to the cholinergic pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent midbrain extrapyramidal areas in the albino rat. I. Retrograde tracing studies" *J. Comp. Neurol.*, 321: 515-543.

STORMANN, T.M., GDULA, D.C., WEINER, D.M. y BRAINANN, M.R., 1990. "Molecular cloning and expression of a dopamine D2 receptor from human retina". *Mol. Pharmac.* 37: 1-6.

STRATFORD, T.R. y WIRTSHAFTER, D., 1990.
"Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat". *Brain Res.*, 511: 173-176.

SUENSSON, T.H. y TUNG, C.S. 1989.
"Local evolving of prefrontal cortex induces pacemaker-like firing of dopamine neurons in rat ventral tegmental area in vivo". *Acta Physiol. Scand.*, 136: 135-136.

SUGIMOTO, T. y HATTORI, T., 1984.

"Organization and efferent of nucleus tegmenti pedunculo-pontinus pars compacta with special reference to its cholinergic aspects". *Neuroscience*, 11: 931-946.

SUNAHARA, R.K., NIZNIK, H.B., WEINER, D.M., STORMANN, T.M., BRAINANN, M.R., KENNEDY, J.L., GELERNTER, J.E., ROZMAHEL, R., YANG, Y.L., ISRAEL, Y., SEEMAN, P. y O'DOWD, B.F., 1990.
"Human dopamine D1 receptor encoded by an intron less gene on chromosome 5". *Nature*, 347: 80-83.

SURWILLO, W.W., SHAFII, M. y BARRETT, C.L. 1978
"Gilles de la Tourette syndrome: A 20-month study of the effects of stressful life events and haloperidol on symptom frequency". *J.Nerv. Ment. Dis.*, 166: 812-816.

SWANSON. L.W., 1982.
"The projection of ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat". *Brain Res. Bull.*, 9: 321-353.

SWANSON. L.W., SIMMONS, D.M., WHITING, P.J. y LINDSTROM, J., 1987. "Immunohistochemical localization of neural nicotinic receptor in the rodent central nervous system". *J. Neurosci.*, 7: 3334-3342.

TAKADA, M., LI, Z.K. y HATTORI, T., 1988.
"Dopaminergic nigrothalamic projection in the rat". *Brain Res.*, 457: 165-168.

TAKADA, M., CAMPBELL, K.J., MORIIZUMI, T. y HATTORI, T., 1990.
"On the origin of the dopaminergic innervation of the paraventricular thalamic nucleus". *Neurosci. Lett.*, 115: 33-36.

- TANG, L., TODD, R.D., HELLER, A. y O'MALLEY, K.L., 1994
"Pharmacological and functional characterization of D₂, D₃ and D₅ dopamine receptors in fibroblast and dopaminergic cell lines" *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 268: 495-502.
- TASSIN, J.P., 1992.
"NE/DA interactions in the pre-frontal cortex and their possible roles as neuromodulators in schizophrenia". *J. Neurol. Transm.*, 36 (suppl.): 135-162.
- TEPPER, J.M., SAWYER, S.F. y GROVES, P.M., 1987.
"Electrophysiologically identified nigral dopaminergic neurons intracellularly labeled with HRP: light-microscopic analysis". *J. Neuroscience*, 7: 2794-2806.
- TIBERI, M., JARVIE, K.R., SILVIA, C., FALARDEAU, P., GINGRICH, J.A., GODINOT, N., BERTRAND, L., YANG, F.T., FREMEAU, R.J. y CARON, M.G., 1991.
"Cloning molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat Brain compared with the D1A receptor". *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 7491-7495.
- TOKUNO, H., MORIIZUMI, T., KUDO, M., NAKAMURA, Y. 1988.
"A morphological evidence for monosynaptic projections from the nucleus tegmenti pedunculopontinus pars compacta (TPC) to nigrostriatal projection neurons". *Neurosci. Lett.*, 85: 1-4.
- TRULSON, M.E., PREUSSLER, D.W. y HOWELL, G.A., 1981.
"Activity of substantia nigra units across the sleep-waking cycle in freely moving cats". *Neurosci. Lett.*, 26: 183-188.
- UNGERSTEDT, U., 1971.
"Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain". *Acta Physiol. Scan. [Supl]*, 367: 1-48.
- VALLAR, L., MUCA, C., MAGNI, M., ALBERT, P., BUNZOW, J., MELDOLESI, J. y CIVELLI, O. 1990.

"Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in LtK fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca^{2+} concentration decrease in GH4C1 cells". *J. Biol. Chem.*, 265: 10320-10326.

VAN DER KOOY, D. y HATTORI, T., 1980.
"Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: a fluorescent retrograde double labeling study in the rat". *Brain Res.*, 186: 1-7.

VAN DEL POL, A.N., SMITH, A.D. y POWELL, J.F., 1985.
"Gaba axons in synaptic contact with dopamine neurons in the substantia nigra: double immunocytochemistry with biotin-peroxidase and protein A-colloidal gold". *Brain Res.* 348 146-154.

VAN TOL, H.H.M., BUNZOW, J.R., GUAN, H-C., SUNAHARA, R.K., SEEMAN, P., NIZNIK, H.B. y CIVELLI, O., 1991.
"Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine". *Nature*, 350: 610-614.

VAN WOERT, M.N., JUTKOWITZ, R., ROSENBAUM, D., y BOWERS, M.B., Jr., 1976.
"Gilles de la Tourette's syndrome: Biochemical approaches". En: *The Basal Ganglia*. M.D. Yahr, ed. Raven Press, New York, pp. 459-465.

VILARO, M.T., PALACIOS, J.M. y MENGOD, G., 1990.
"Localization m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry". *Neurosci. Lett.*, 114: 154-159.

VILARO, M.T., WIEDERHOLD, K.H., PALACIOS, J.M. y MENGOD, G. 1992. "Muscarinic M2 receptor mRNA expression and receptor binding in cholinergic and non-cholinergic cells in the rat brain: a correlative study using in situ hybridization histochemistry and receptor autoradiography" *Neuroscience*, 47: 367-393.

VINCENT, S., HOKFELT, T., CHRISTENSSON, I. y TERENIUS, L. 1982a. "Immunohistochemical evidence for a Dynorphin immunoreactive striato

nigral pathway". *Eur. J. Pharmacol.*, 85: 251-252.

VINCENT, S., H~KFELT, T., CHRISTENSSON, I. y TERENIUS, L. 1982b. "Dynorphin immunoreactive neurons in the central nervous system of the rat". *Neurosci. Lett.*, 33: 185-190.

VINCENT, S.R., SATOH, K., ARMSTRONG, D.M. y FIBIGER, H.C. 1983. "Substantia P in the ascending cholinergic reticular system". *Nature*, 306: 688-691.

VOGT, M., 1954.

"The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs". *J. Physiol.*, 123: 451-81.

WADA, E., WADA, K. E..., LTE~ .: DENERIS E - HEINERMANN, S., PATRICK, J. y SWANSON L.W. 1989
"Distribution of α_2 , α_3 , α_4 and β_2 neural nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system a hybridization histochemical study in the rat". *J. Comp. Neurol.*, 284: 314-335.

WALTERS, J. R. y LAKOSKI, J.M., 1978.

"Effect of muscimol on single unit activity of substantia nigra dopamine neurons". *Eur J. Pharmacol.*, 47: 469-471.

WANG, R.Y., 1981.

"Dopaminergic neurons in the rat ventral tegmental area. I. Identification and characterization" *Brain Res. Rev.*, 3: 123-140.

WANG, J.X., ROESKE, W.R., HAWKINS, K.N., GEHLERT, D.R. y YAMAMURA, H.I., 1989.

"Quantitative autoradiography of M2 muscarinic receptors in the rat brain identified by using a selective radioligand [3 H]AF-DK116". *Brain Res.*, 477: 322-326.

WASSEF, M., BEROD, A. y SOTELO, C., 1981.

"Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and

their striatal input. Combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration". *Neuroscience*.

WASZCZAK, B.L., ENG, N. y WALTERS, J.R., 1980.

"Effects of muscimol and picrotoxin on single unit activity of substantia nigra pars reticulata neurons". *Brain Res.*, 188: 185-197.

WASZCZAK, B.L. y WALTERS, J., 1983.

"Dopamine modulation of the effects of γ -aminobutyric acid on substantia nigra pars reticulata neurons". *Science*, 220: 218-221.

WASZCZAK, B.L., LEE, E.K., FERRARO, T., HARE, T.A. y WALTERS, J.R., 1984.

"Single unit responses of substantia nigra pars reticulata neurons to apomorphine: effects of striatal lesions and anesthesia". *Brain Res.*, 306: 307-318.

WASZCZAK, B.L. y WALTERS, J.R., 1984.

"A physiological role for dopamine as modulator of GABA effects in substantia nigra: supersensitivity in 6-hydroxydopamine-lesioned rats". *J. Pharmacol.*, 105: 369-373.

WASZCZAK, B.L. y WALTERS, J.R., 1986.

"Endogenous dopamine can modulate inhibition of substantia nigra pars reticulata neurons elicited by GABA iontophoresis or striatal stimulation". *J. Neuroscience*, 6: 120-126.

WASZCZAK, B.L., 1990.

"Differential effects of D1 and D2 dopamine receptor agonists on substantia nigra pars reticulata neurons". *Brain Res.*, 513: 125-135.

WEBER, E., ROTH, K.A. y BARCHAS, J.D., 1982.

"Immunohistochemical distribution of β -neo-endorphin/dynorphin neuronal systems in rat brain: evidence for colocalization". *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S. A.*, 79: 3062-3066.

WEINER, D.M., LEVEY, A.I. y BRANN, M.R., 1990.

"Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 7050-7054.

WEINER, D.M., LEVEY, A.I., SUNAHARA, R.K., NIZNIC, H.B., O'DOWD, B.F., SEEMAN, P. y BRAINANN, M.R., 1991.

"D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat Brain": Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 88: 1859-1863.

WEINSHANK, R.L., ADHAM, N., MACCHI, M., OLSEN, M.A, BRANCHEK, T.A. y HARTING, P.R., 1991.

"Molecular cloning and characterization of a high affinity dopamine receptor (D, beta) and its pseudogene" J. Biol Chem., 266: 22427-22435

WESTERINK, B.H.C., 1979

"Further studies on the sequence of dopamine metabolism in the rat Brain". Eur. J. Pharmacol., 56 313-322

WIGHMAN, R.M. y ZIMMERMAN, J.B. 1990.

"Control of dopamine extracellular concentration in rat striatum by impulse flow and uptake" Brain Res. Rev., 15: 135-144.

WILSON, C.J., YOUNG, S.J. y GROVES, P.M., 1977.

"Statistical properties of neural spike trains in the substantia nigra: cell types and their interactions". Brain Res., 136: 243-260.

WOOLF, N.J. y BUTCHER, L.L., 1986.

"Cholinergic systems in the rat brain: II. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia and basal forebrain". Brain Res. Bull., 16: 603-637.

WOOLF, N.J. y BUTCHER, L.L., 1989.

"Cholinergic system in the rat brain: IV Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum". Brain Res. Bull., 23: 519-540.

WURTMAN, R.J., LARIN, F., MOSTAFAPOUR, S. y FERSTROM, J.

1974. "Brain catechol synthesis: control by Brain tyrosine concentration". Science, 185: 183-184.

- WURTMAN, R.J., SCALLY, M.C., GIBSON, C.J. y HEFTI, F., 1979.
"Relation between Brain tyrosine and catecholamine synthesis". En:
Catecholamines: basic and clinical frontiers, Usdin, E., Kopin, I.I. y
Barchas, J.D, Pergamon Press, New York, pp. 64-66.
- YANAGIHASHI, A., YAMANOUCHI, K. y ISHIKAWA, T., 1991.
"The effects of apomorphine on the hippocampal field potential in freely
moving rats: pharmacological evidence of the involvement of D2 receptors".
Neuropharmacology, 30: 177-182.
- YI, S.-J., GIFFORD, A.N., y JOHNSON, K.M., 1991.
"Effect of cocaine and 5-HT₂ receptor antagonist on 5-HT-induced [³H]-
dopamine release from rat striatal synaptosomes" *Eur. J. Pharmacol.* 199
185-189.
- ZAMIR, N., PALKOVITS. M., WEBER, E., MEZEY, E. y BROWNSTEIN, M.
J. 1984.
"A dynorphinergic pathway of Leu-enkephalin production in rat substantia
nigra". *Nature*, 307: 643-645
- ZHANG, J., CHIODO, L.A., FREEMAN, A.S. 1992.
"Electrophysiological effects of MK-801 on rat nigrostriatal and
mesoaccumbal dopaminergic neurons". *Brain Res.*, 590: 153-163.
- ZHOU, Q.Y., GRANDY, D.K., THAMBI, L., KUSHNER, J.A., VAN, T.H.,
CONE, R., PRIBNOW, D., SALOM, J., BUNZOW, J.R. y CIVELLY, O.,
1990. "Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptor".
Nature 347: 76-80.
- ZWEIG, R.M., WHITEHOUSE, P.J., CASANOVA, M.F., WALKER. L.C.,
JANKEL y PRICE, C.L., 1987.
"Loss of pedunclopontine neurons in progressive supranuclear palsy"
Ann. Neurol., 22: 18-25.
- ZWEIG, R.M., JANKEL, W.R., HEDREEN, J.C., MAYEUX M.D. y PRICE,
D. L. 1989.
"The pedunclopontine nucleus in Parkinson's disease". *Ann eurol.* 26:41-
46.