

1994-B

087609618

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS  
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AMBIENTALES.



PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO EN EL TRANSPORTE  
(CAPTURA Y LIBERACION) DE DOPAMINA  
EN EL CUERPO ESTRIADO.

---

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A

VERONICA CHAPARRO HUERTA

GUADALAJARA, JAL. ABRIL DE 1995

---



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**

Expediente.....

Número .....

Sección .....

**C. VERONICA CHAPARRO HUERTA**

**P R E S E N T E . -**

Manifiestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO EN EL TRANSPORTE (CAPTURA Y LIBERACION) DE DOPAMINA EN EL CUERPO ESTRIADO" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Carlos Beas Zarate.

**A T E N T A M E N T E**

**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas Zapopan, Jal. 7 de febrero de 1994

EL DIRECTOR

DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS



FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO

M. EN C. MA. GEORGINA GUZMAN GODINEZ



BIBLIOTECA CENTRAL

c.c.p.- M. en C. Carlos Beas Zarate, Director de Tesis.-pte.

c.c.p.- El expediente del alumno

Al contestar este oficio cifrese fecha y número

C. Dr. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE.  
DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS  
BIOLOGICAS Y AMBIENTALES  
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

P R E S E N T E

Por medio de la presente nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) pasante VERONICA CHAPARRO HUERTA código 087609618 con el título PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO EN EL TRANSPORTE (CAPTURA Y LIBERACION) DE DOPAMINA EN EL CUERPO ESTRIADO, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

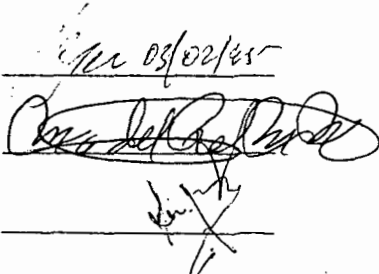
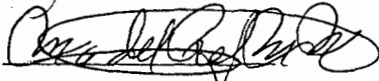

Las Agujas Nextipac, Zapopan, Jal., Febrero de 1995.

EL DIRECTOR DE TESIS

  
M. en C. Carlos Beas Zárate

SINODALES

1. Dra. Galina Petrovna Zaitseva
2. M. en C. Ma. del Refugio Mora N.
3. M. en C. Luis A. Burgos R.

  
03/02/95  
  


Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neuroquímica del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección del M. en C. Carlos Beas Zárate.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradezco al M. en C. Carlos Beas Zárate por su tutoría en la realización de este trabajo y por todo el apoyo que siempre me brindó.

Agradezco a todos mis amigos y compañeros por su amistad y apoyo para seguir adelante y por su colaboración en la realización de este trabajo.

#### A MIS PADRES

Su belleza interior es lo que más me gusta,  
son la imagen que idolatré siempre.  
No me imagino una vida sin ustedes a mi lado,  
apoyándome y levantándome cuando caigo.  
Son la luz que necesitan mis ojos,  
la fuerza que apoya mis decisiones,  
la alegría de mis penas.  
En fin, son mi mundo y el tesoro máspreciado que  
deseo conservar toda la vida.

## INDICE GENERAL

Lista de Abreviaturas .....	i
Resumen .....	iii
Introducción .....	1
Antecedentes .....	10
Hipótesis .....	15
Objetivos .....	17
Diagrama Experimental .....	19
Material y Métodos .....	21
Resultados .....	25
Discusión .....	28
Conclusiones .....	33
Figuras.....	35
Bibliografía .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

A.A.	Amino ácido
A.A.E.	Amino ácido excitatorio
Ach	Acetilcolina
AMPA	Acido propiónico 3-amino-4-hidroxi-5-metil- isoxasol
ATP	Adenosin trifosfato
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
Ca <sup>++</sup>	Ión Calcio
CA	Catecolaminas
Cl <sup>-</sup>	Ión Cloro
CNQX	6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DA	Dopamina
DAérgica	Dopaminérgica
fmol	Fentomol
GABA	Acido gamma-amino butírico
GAMS	Acido D-gamma-glutamilaminometanosulfónico
Glu	Glutamato
Gluérgica	Glutamatérgica
Gly	Glicina
GMPC	Guanosin monofosfato cíclico
<sup>3</sup> H	Tritio
5-HT	Serotonina
5-HTérgica	Serotoninérgica
K <sup>+</sup>	Ión Potasio
KA	Kainato
KCl	Cloruro de Potasio
L-Arg	L-arginina
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
Mg <sup>++</sup>	Ión Magnesio
mg	Miligramo
min	Minuto
MK-801	Dizocilpina
μl	Microlitro
μM	Micromolar



mCi	Milicurie
mM	Milimolar
Na <sup>+</sup>	Ión Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NAérgica	Noradrenérgica
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de Sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Sodio Dibásico
NE	Norepinefrina
Nitro-Arg	NG-nitro-L-arginina
NMDA	N-metil-D-aspartato
ON	Oxido Nítrico
ONS	Oxido Nítrico Sintetasa
PCP	Fenciclidina
PLT	Potencial de Largo Término
R-AMPA	Receptor a AMPA
R-Glu	Receptor a Glu
R-Kainato	Receptor a Kainato
R-NMDA	Receptor a NMDA
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
Zn <sup>++</sup>	Ión Zinc

## RESUMEN

El estriado recibe una aferencia DAérgica y una Gluérgica que provienen de la sustancia negra y de la corteza cerebral, respectivamente. Por lo que, desde hace algunos años, la interacción entre el sistema Gluérgico y DAérgico ha sido de gran interés, ya que se ha involucrado su participación en diferentes procesos patológicos de algunas enfermedades neurodegenerativas, tales como: el Parkinson, la esquizofrenia, la enfermedad de Huntington. Además, la continua activación de receptores a Glu produce una entrada excesiva de calcio, lo que promueve la síntesis de ON, el cual parece tener un papel importante en la patología del SNC; por lo que un exceso en la activación de estos receptores, contribuye a la neurotoxicidad por una elevada producción de ON, el cual a su vez se implica en la señal célula-célula y en algunas formas de daño excitotóxico. Sin embargo, no se conoce con precisión si la estimulación de los receptores a Glu participan en la regulación del transporte de DA en el estriado de la rata. Por lo que en el presente trabajo se determinó la captación y liberación de [<sup>3</sup>H]-dopamina en presencia de agonistas y antagonistas a Glu, así como en presencia de L-arginina (precursor del ON) y de Nitro-arginina (inhibidor de la ONS), en rebanadas del cuerpo estriado de la rata.

Los resultados muestran que la L-arginina no modificó la captación de DA, sin embargo, se reduce con Nitro-arginina 10 y 100  $\mu\text{M}$  en el orden de 33% y 41%, respectivamente. El NMDA, Kainato y L-arginina estimulan la liberación espontánea de DA, misma que se inhibe por los antagonistas MK-801, GAMS y Nitro-arginina (10 $\mu\text{M}$ ), mientras que el Quiscualato no tuvo efecto.

Estos resultados indican la participación del R-NMDA y R-Kainato en la liberación espontánea de DA y sugieren la posible participación del ON en la regulación del transporte de DA.

# *INTRODUCCION*

El sistema nervioso (SN) es el conjunto de estructuras funcionalmente especializadas, mediante las cuales el organismo responde adecuadamente a los estímulos que recibe del medio externo e interno (1). Este sistema se divide en: **Sistema Nervioso Central (SNC)**, formado por el encéfalo (cerebro) y la médula espinal y el **Sistema Nervioso Periférico (SNP)**, estructurado por nervios que se denominan ganglios nerviosos (1).

El tejido Nervioso está constituido por dos componentes principales: las células neuronales y varios tipos de células de la glía o neuroglía (1).

La neurona constituye la unidad morfológica y funcional del SN; cada neurona posee un cuerpo celular que contiene un núcleo, del cual parten prolongaciones, tales como: 1) las dendritas, cuya función es recibir los estímulos del medio ambiente, de células epiteliales sensoriales o de otras neuronas; y 2) el axón que constituye una prolongación única especializada en la conducción de impulsos nerviosos que transmiten la información de una neurona a otra célula que puede ser nerviosa, muscular o glandular, (2).

### *Sinápsis*

La zona en donde dos neuronas están en contacto se llama **sinápsis**, las más frecuentes en cuanto a las estructuras celulares anatómicas implicadas son: a) axodendríticas, b) axosomáticas y c) axoaxónicas (2).

En las sinápsis del SN de muchos invertebrados y vertebrados, la transmisión parece llevarse a cabo por medio de sustancias químicas de cuya acción depende el efecto que tiene el impulso nervioso, una vez que llega a la unión sináptica; por esta razón se denominan, **sinápsis**

**químicas.** Estas se clasifican en dos tipos; **a)** excitatorias e **b)** inhibitorias.

En las **sinápsis excitatorias** el efecto postsináptico del mediador es una disminución del potencial de reposo de la membrana, lo que conduce a su despolarización a través de la apertura de los canales iónicos específicos para sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) con activación de una segunda neurona (1). El glutamato se ha propuesto como el principal mediador en las sinápsis excitatorias en el SNC (7). En las **sinápsis inhibitorias**, la acción del mediador sobre la membrana postsináptica produce cambios que conducen a su hiperpolarización por apertura de canales iónicos específicos para  $\text{K}^+$  y Cloro ( $\text{Cl}^-$ ), con disminución de la excitabilidad de la membrana postsináptica, lo que impide la activación de la neurona (1).

*Ubicación Neuroanatómica y Funcional del Cuerpo  
Estriado en el Cerebro*

El cerebro se encuentra dividido por una cisura longitudinal profunda en dos porciones simétricas denominadas hemisferios cerebrales. Ambos hemisferios incluyen estructuras telencefálicas como la corteza cerebral, sustancia blanca profunda, núcleos basales y cuerpo calloso (2).

En un corte antero-posterior de los hemisferios cerebrales se observan perfectamente (entre otras estructuras) los núcleos basales ó ganglios basales, que son: claustrum, núcleo lenticular, núcleo amigdalino y núcleo caudado, los tres últimos forman el cuerpo estriado (1) (Fig 1).

El papel más importante del cuerpo estriado es actuar como eslabón del procesamiento de información entre la corteza de asociación (con relación a la memoria) y con el manejo de la experiencia sensorial para las respuestas

significativas (2). Interviene en la regulación del tono y la postura, en la estabilización y coordinación del movimiento y es base importante de los procesos de aprendizaje (1).

#### Conexiones aferentes al estriado

Existen fibras que se originan de todas las regiones corticales y que se proyectan en forma somatotópicamente organizada al estriado, denominadas **conexiones cortico-estriatales**, las cuales utilizan al amino ácido excitatorio (AAE) glutamato, como neurotransmisor (3) (Fig 2). Así, el estriado recibe fibras de los núcleos intralaminares, del centro mediano y dorsomedial del tálamo, que terminan tanto en el caudado como en el putamen, a éstas se les denomina **Conexiones Talamoestriatales** (1,4) (Fig 2).

Por último, una de las vías aferentes más importantes al putamen, son fibras que se originan en la *pars compacta* y *reticulata* de la sustancia negra, ascienden al subtálamo y pasan entre las fibras de la cápsula interna y de ahí al caudado y al pálido; denominadas **Conexiones Negro-estriatales**, las cuales utilizan dopamina como neurotransmisor (5) (Fig 2).

#### Conexiones eferentes del estriado

El núcleo caudado y el putamen se relacionan por medio de fibras internucleares. La mayor proyección eferente del estriado es hacia el pálido, al cual llegan fibras del caudado y del putamen (6). También se ha demostrado una organización somatotópica precisa en esta proyección **estriado-palidal** (7,8). Además, se han descrito proyecciones **estriado-talámicas** y **estriado-negrales** (1) (Fig 2).

Un primer nivel de organización funcional compartamentalizada en el estriado se relaciona con separar poblaciones de neuronas estriatales que proyectan al globo

pálido y a la sustancia negra. El segundo nivel de organización es la segregación de neuronas hacia el compartimento que conforman núcleos celulares, los cuales tienen distintos blancos de proyección y proporcionan entrada a las áreas que contienen neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) y gabaérgicas (GABAérgicas) en la sustancia negra (9).

#### Vías Dopaminérgicas

Los cuerpos celulares de la porción compacta de la sustancia negra y de la región dorsal al núcleo interpeduncular, tienen concentraciones elevadas de DA. Los axones que se originan en la zona compacta ascienden sucesivamente a través del globo pálido y de la cápsula interna hacia el neostriado. Este sistema negroestriado DAérgico se integra a los circuitos de los núcleos basales. Algunas fibras DAérgicas de la sustancia negra terminan en el cuerpo amigdalóideo. Las fibras que se originan en las células dorsales al núcleo interpeduncular ascienden en el tracto medial del cerebro anterior y terminan en el hipotálamo, en el cuerpo amigdalóideo y en otras porciones del lóbulo límbico. Algunas neuronas DAérgicas se proyectan a la hipófisis (1) (Fig 3).

Las neuronas DAérgicas en el cerebro medio, las cuales se localizan en el área tegmental ventral, en la sustancia negra *pars compacta*, *pars reticulata*, y en el área retrorrubral; proporcionan retroalimentación al estriado y a la corteza prefrontal (9) (Fig 3).

#### Dopamina

La dopamina (DA) es una catecolamina (CA) que se forma en el cerebro a partir del amino ácido tirosina, el cual se extrae del torrente sanguíneo para concentrarse en las células neuronales por medio de un mecanismo de transporte activo. La tirosina una vez dentro de las neuronas se transforma en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por medio

de la tirosina hidroxilasa, enzima que constituye el factor limitante en la síntesis de CA. Posteriormente la L-DOPA se descarboxila por medio de la descarboxilasa de los amino ácidos aromáticos para formar la DA y  $\text{CO}_2$ . En las neuronas noradrenérgicas (NAérgicas) la DA se hidroxila por la acción de la DA- $\beta$ -hidroxilasa para dar origen a la norepinefrina (NE). Esta enzima se encuentra en las vesículas sinápticas de tal forma que la DA en el momento de almacenarse se transforma a NE en las neuronas NAérgicas (10) (Fig 4).

La alta concentración de DA en el estriado fue descubierta hace aproximadamente 29 años por Carlsson (1959) (11), desde entonces, se considera a la DA no sólo como un precursor de la NE sino como un transmisor independiente en el estriado. En la actualidad existen evidencias claras de que la DA es un transmisor inhibitorio de las células de la sustancia negra cuyas proyecciones se envían al estriado (12,13).

#### *Mecanismo de liberación y recaptura de DA*

Cuando llega un estímulo a una célula nerviosa se abren canales a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , que regulan la entrada de estas iones a diferentes velocidades, lo cual origina una despolarización de la membrana y la apertura de los canales de calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) sensibles a voltaje. Los iones  $\text{Ca}^{++}$  entran a la terminal nerviosa siguiendo su gradiente de concentración y activan los mecanismos responsables de la liberación del neurotransmisor DA (14). Una vez liberado el transmisor, este sólo es efectivo si interactúa con el receptor específico, esta unión puede conducir a la apertura de canales iónicos o inducir cambios metabólicos en la célula postsináptica. Después de actuar sobre su receptor y completar el proceso de transmisión, éste es inactivado (removido del espacio intersináptico) por el comienzo de un re-transporte hacia la terminal nerviosa, mediante la acción de transportadores específicos presentes



sobre la membrana presináptica. Distintos transportadores pueden capturar la DA, la cual puede ser reutilizada en vesículas de almacenamiento o metabolizada (15). Específicamente el transporte de DA a nivel vesicular resulta ser dependiente de ATP y de iones  $Mg^{++}$  (16,17,18,19) (Fig 4).

#### *Receptores a Glutamato*

El glutamato (Glu) se considera el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC; éste interactúa con receptores de membrana específicos, cuya interacción está implicada en algunas funciones neurológicas tales como el aprendizaje, memoria, movimiento y sensación. Además son importantes en el desarrollo de conexiones sinápticas en el SN (20,21).

Existen dos clases de receptores postsinápticos a Glu (R-Glu): los **ionotrópicos**, que se acoplan funcionalmente a canales iónicos de membrana (21) y los **metabotrópicos**, que se acoplan a proteínas G y modulan segundos mensajeros intracelulares, tales como, inosítoles, diacilglicerol, calcio y nucleótidos cíclicos (21). Dentro de los receptores **ionotrópicos** a Glu se han descrito tres subtipos: el N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido D-L- $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) y el Kainato (KA) (21,22,23).

El complejo protéico que constituye al receptor tipo NMDA (R-NMDA) consiste en un canal iónico de membrana, altamente permeable a  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{++}$  que presenta dependencia al voltaje y posee sitios reguladores, particularmente, de unión a glicina (Gly), Zinc ( $Zn^{++}$ ), poliaminas y fenciclidina (PCP), los cuales afectan la apertura del canal. También posee un sitio sensible a cambios de óxido-reducción (redox), el cual cuenta con uno o más grupos tioles (sulfidrilos [SH]); este sitio reacciona en su estado de oxidación con analógos del tipo

óxido nítrico (ON) para formar un S-nitrosotiol (NO-S) lo que permite facilitar la formación de enlaces disulfuro (23).

El segundo subtipo de receptor se activa por AMPA (R-AMPA), ácido quisquálico o Glu, pero no por NMDA, su canal iónico es permeable a Na<sup>+</sup> y posiblemente a Ca<sup>++</sup>, además, posee un sitio modulador a benzodiazepinas que modifica la sensibilidad del receptor por sus agonistas y que puede inhibir la respuesta del receptor (23).

El tercer subtipo de receptor se activa por KA o Glu (R-Kainato), pero no por AMPA o NMDA. El canal iónico asociado a este canal tal vez sea permeable a Ca<sup>++</sup>, pero en general parece preferir cationes monovalentes. Los dos últimos subtipos de receptores son designados en forma genérica como receptores no-NMDA (23) (Fig 5).

El canal activado del R-NMDA permite la entrada de Ca<sup>++</sup>, así como de Na<sup>+</sup> y la sobre estimulación de este tipo de receptores es un mecanismo que permite incrementar la concentración de Ca<sup>++</sup> en el interior de las neuronas; ésta entrada masiva de Ca<sup>++</sup> es dependiente de voltaje y posiblemente participe como mediador de la neurotoxicidad inducida por Glu (23,24); ya que uno de los requerimientos para que se presente la muerte celular es que la entrada de Ca<sup>++</sup> exceda su salida (25).

#### *Papel del Oxido Nítrico en el cerebro y sus implicaciones*

El óxido nítrico (ON) es un radical libre altamente tóxico, que en condiciones atmosféricas se encuentra en estado gaseoso (26). El ON se forma fisiológicamente en el cerebro a nivel de la célula postsináptica (27), por la acción de la óxido nítrico sintetasa (ONS) a partir del amino ácido L-arginina (L-Arg) vía un mecanismo dependiente de Ca<sup>++</sup>/calmodulina (28,29,30), éste atraviesa la membrana

celular fácilmente por difusión (31) y estimula la liberación de neurotransmisores de sitios presinápticos localizados probablemente en células distintas de aquellas que lo sintetizaron (32) (Fig 6). Con la excesiva activación del R-NMDA se eleva la concentración intracelular de  $Ca^{++}$  y se activa la ONS lo que conduce a la producción de ON y subsecuentemente a la neurodegeneración (33). La generación de ON se ha implicado en la mediación de la toxicidad inducida por Glu en cultivos corticales primarios (34), así como en varios procesos patofisiológicos (35). El daño neuronal mediado por radicales libres, tal vez converge con una vía común en el daño excitotóxico y otras formas de daño en el SNC (36).

El ON se considera una de las moléculas mensajeras más importantes en el cerebro, ya que sirve como un mensajero intraneuronal semejante a un neurotransmisor (26,28,29). El ON parece estar implicado en varios procesos fisiológicos, tales como relajación muscular, inhibición plaquetaria, regulación inmune, entre otros (30,37). Además, ejerce un efecto neuromodulador sobre la liberación de ciertos neurotransmisores (29,32), estimula la síntesis de GMPc (31,33) y aparenta ser el responsable de la depresión sináptica de largo término. En el hipocampo, posiblemente participe vía formación GMPc en el establecimiento del Potencial de Largo Término (PLT) inducida por la activación sostenida de R-NMDA (20,38). La activación de R-Glu, específicamente del tipo NMDA en células granulares cerebelares en suspensión, estimula la liberación de ON (39,40,41). Mientras que las células microgliales son capaces de producir ON, después de su activación con una variedad de estímulos, incluyendo la aplicación de Glu (42).

*ANTECEDENTES*

El estriado recibe una aferencia DAérgica y una Gluérgica que provienen de la sustancia negra y de la corteza cerebral, respectivamente (43,44,45). Por lo que desde hace algunos años ha sido de gran interés la interacción entre el sistema Gluérgico y DAérgico, ya que ambos parecen estar involucrados en diferentes procesos patológicos de algunas enfermedades neurodegenerativas, tales como: 1) el Parkinson en el que se presentan transtornos que ilustran bien las consecuencias de las lesiones de los núcleos basales (pálido y sustancia negra); los síntomas más notables son la rigidez, pobreza de movimientos, temblor y balanceo de brazos (1); 2) la esquizofrenia que consiste en un aumento tónico DAérgico con síntomas clínicos relacionados estrictamente con una deficiencia en la transmisión Gluérgica central (46); y 3) la enfermedad de Huntington que se produce por una pérdida importante de neuronas en el estriado y globo pálido, que se acompaña de una reducción en la actividad de la colina acetiltransferasa y de la descarboxilasa del ácido glutámico (20,47).

La liberación de DA puede ser regulada por otros transmisores o sustancias neuroactivas presentes normalmente en el estriado. Además, la liberación de algunos de estos neurotransmisores puede modificarse por acción de la DA (48). La acetilcolina (ACh) fue el primer neurotransmisor descrito en incrementar la liberación de DA *in vitro* (48). Este hecho se confirmó en algunos estudios y se demostró que el efecto ejercido por la ACh era mediado por la activación de receptores muscarínicos y nicotínicos; esto tal vez sea parte de un mecanismo de retroalimentación que puede ser de gran importancia fisiológica, ya que varias evidencias sugieren que el control de DA ejercido por la transmisión colinérgica en el estriado es necesaria para una función motora normal (48).

Diversos grupos han reportado un incremento en la liberación de DA por GABA en rebanadas estriatales de rata mediante diferentes técnicas (49). Esto ha llevado a postular que el efecto estimulador del GABA sobre la liberación de DA está en relación a la entrada del amino ácido hacia las terminales DAérgicas (50). De igual manera la glicina incrementa la liberación de DA en rebanadas estriatales, sin embargo, no resulta claro si actúa indirectamente sobre las terminales DAérgicas o por una interferencia de la tetrodotoxina sobre receptores localizados en las terminales DAérgicas (51).

También existen evidencias de una interacción entre las terminales DAérgicas y las serotoninérgicas (5HT-érgica) que el estriado recibe, ya que la liberación de DA en sinaptosomas estriatales se estimula en presencia de serotonina (5-HT) (52). Además algunos antagonistas 5-HTérgicos bloquean la liberación de DA que se induce por agonistas de 5-HT (52). Asimismo, se sugiere la existencia de una interacción facilitatoria tónica de NE sobre las neuronas DAérgicas en el estriado, por la presencia de receptores adrenérgicos presinápticos, ya que los efectos de agonistas adrenérgicos son persistentes aún en la presencia de tetrodotoxina (53).

Estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que las neuronas Gluérgicas ejercen un efecto estimulador sobre las terminales DAérgicas en el estriado, efecto que parece estar asociado con la regulación presináptica de la liberación de DA en dichas terminales nerviosas (55,56,57). Estas y otras evidencias han llevado a proponer la existencia de una regulación recíproca entre la DA y el Glu en el estriado (55).

La regulación del transporte de DA por Glu en el estriado parece ser mediado por el R-NMDA (58), ya que algunos de los antagonistas del NMDA son capaces de

bloquear los efectos del Glu sobre el transporte de DA (59,60,61). La presencia de R-NMDA en terminales DAérgicas podría explicar la posible participación de este receptor en el desarrollo de algunos procesos neurodegenerativos y así como los efectos neurotóxicos de algunas drogas en el estriado (62,63).

La producción de ON podría tener un papel importante en las patologías del SNC (64); ya que la entrada de  $Ca^{++}$  que acompaña a una activación sostenida de los R-NMDA parece estar asociada con el daño neuronal (65,66), y la neurotoxicidad a través de una elevación en la producción de ON (34).

Estudios de unión de antagonistas a Glu han demostrado que los R-NMDA son exclusivamente postsinápticos en el estriado de rata, lo que sugiere la posibilidad de que el ON se sintetice en neuronas postsinápticas a los sitios de liberación del Glu, este mecanismo implica la participación de la ONS, así como la formación de GMPC (32).

Por otro lado, diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, en cultivos de hipocampo, retina, neuronas neocorticales de ratón y rebanadas cerebelares han demostrado que la toxicidad causada por Glu se inhibe con antagonistas al R-NMDA, los cuales reducen substancialmente la degeneración celular (25,58). En 1991, Dawson y col.(34) demostraron protección contra la excitotoxicidad, a través de inhibidores de la ONS, como monometil-L-arginina y  $N^G$ -nitroarginina (Nitro-Arg), los cuales producen una reducción dependiente de la dosis de la muerte celular inducida por NMDA (34). Estos compuestos también intervienen con la degeneración neuronal inducida en cultivos corticales primarios (35). La Nitro-Arg se ha reportado como el más potente inhibidor de la ONS tanto *in vitro* como *in vivo* (67).

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, demuestran que el Glu en su forma de sal monosódica administrado sistémicamente a ratas durante la etapa perinatal induce cambios importantes en algunos parámetros neuroquímicos y morfológicos en el estriado, la corteza cerebral y el hipocampo. Estos cambios han sido principalmente sobre el número y afinidad de unión de receptores muscarínicos para ACh, así como una reducción sustantiva en la captación y liberación de NE en la corteza cerebral (20,68,69) y en particular un incremento en la captación y liberación de DA en el estriado, por el efecto del Glu (71). Sin embargo, con estos resultados y otros descritos en la literatura no se ha precisado si la producción del ON pudiera estar implicada en el mecanismo por el cual el Glu regula el transporte de DA en el estriado.



## ***HIPOTESIS***

Si la regulación Gluérgica sobre el transporte de DA en el estriado es dependiente de la producción de óxido nítrico (ON), luego entonces, la inhibición de la óxido nítrico sintetasa (ONS) reducirá el transporte de este neurotransmisor.

## ***OBJETIVOS***

## GENERAL:

Evaluar si la producción de ON en el cuerpo estriado está implicada en la regulación que ejerce el Glu sobre el transporte de DA estriatal.

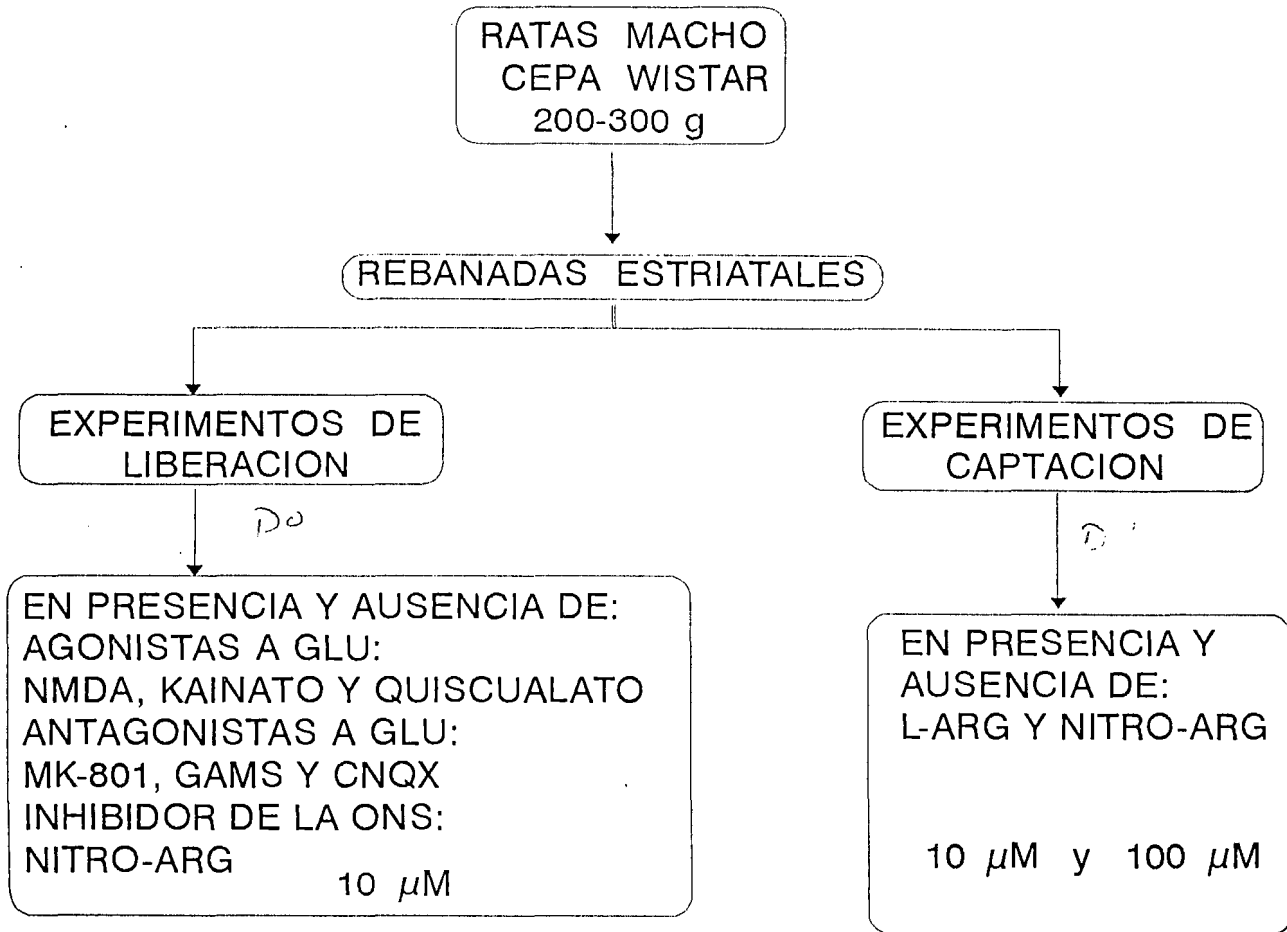
## PARTICULARES:

Determinar el efecto de la inhibición de la ONS y de la síntesis de ON sobre la captura de DA en rebanadas del cuerpo estriado.

Determinar el efecto de agonistas y antagonistas de Glu, así como de la inhibición de la ONS, sobre la liberación de DA en rebanadas estriatales.

# ***DIAGRAMA EXPERIMENTAL***

# DIAGRAMA EXPERIMENTAL



***MATERIAL Y METODOS***

## Material

Las diversas drogas que se utilizaron en el presente trabajo tales como: L-arginina (precursor de la síntesis de ON), Iproniazid y L-N<sup>6</sup>-Nitroarginina (inhibidor de la ONS) fueron adquiridas en Sigma Chem. Co. (St. Luois, MO, EUA); mientras que el N-metil-D-aspartato, Kainato y Quiscualato (agonistas a Glu); Dizocilpina (MK-801), ácido D-gamma-glutamilaminometanosulfónico (GAMS) y 6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) (antagonistas a Glu) se obtuvieron de RBI (Natick, MA, EUA). El resto de los reactivos como: NaCl, NaHCO<sub>3</sub> y CaCl<sub>2</sub> se obtuvieron de J.T.Baker; KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, glucosa y ac. ascórbico fueron de Merck.

La [<sup>3</sup>H]-dihidroxifeniletilamina, [<sup>3</sup>H]-Dopamina ó [<sup>3</sup>H]-DA (46 Ci/mmol) se adquirió de Amersham.

## Composición de las Soluciones

El medio de incubación para captura que se utilizó fue una solución Krebs-bicarbonato, con la siguiente composición: NaCl 110 mM, KCl 3mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Glucosa 10 mM. Mientras que la composición del medio de liberación Krebs-bicarbonato consistió en: NaCl 110 mM, KCl 3mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Glucosa 10 mM; ambas soluciones se les adicionó ac. ascórbico 0.1 mM e Iproniazid 25 µM, ajustados a un pH de 7.2-7.4 con una mezcla de CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> (5%-95%) (19).

## Preparación del tejido.

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar con un peso aproximado de 250-300g, las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio con ciclos de luz-oscuridad 12x12 h con libre acceso al agua y alimento.

Los animales se sacrificaron por decapitación, y se removió el encéfalo, el cual se lavó inmediatamente con una



solución de sacarosa 0.32 M entre 0-4°C. Se disectó el cuerpo estriado y se obtuvieron las rebanadas, de las cuales se pesaron 25 mg para cada estudio. Las rebanadas fueron sometidas a experimentos de captación y liberación espontánea de DA-[<sup>3</sup>H] en ausencia y presencia de diferentes drogas, para los experimentos de captación se utilizaron L-Arg y Nitro-Arg a las concentraciones de 10 y 100 µM; y para los experimentos de liberación se utilizaron L-Arg, Nitro-Arg, los agonistas y antagonistas a Glu en una concentración 10 µM.

#### *Experimentos de captación*

Los experimentos de captación fueron realizados de acuerdo a lo reportado previamente por Heikilla y col. 1975 (70), bajo el siguiente esquema: las rebanadas se preincubaron en 1 ml del medio de captación en un baño María con agitación a 37°C por 10 min, después se adicionó 20 µl de DA-[<sup>3</sup>H] para una concentración de 0.1 µM en el medio, al mismo tiempo se adicionaron las diversas drogas y se incubó durante 20 min. Posteriormente, las muestras se trasladaron a un sistema de filtración con vacío y se lavó con 10 ml del mismo medio. Los filtros utilizados fueron del tipo GF/B (Whatman) con un diámetro de poro de 23µm. Finalmente, cada filtro se trasladó a viales con 5 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo líquido modelo Beckman LS6000.

Paralelamente, se incubaron muestras a una temperatura entre 0-4°C que permitió conocer la captación inespecífica misma que se restó a la que se obtuvo a 37°C. Los resultados se expresan en fmol/mg de tejido/20 min.

#### *Experimentos de liberación*

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito previamente por Beas-Zárate y col (71). Después de realizar la captación de DA-[<sup>3</sup>H], las muestras se trasladaron a un sistema de perfusión de cuatro vías y se perfundieron con el medio de liberación descrito

anteriormente, a un flujo de 0.5 ml/min durante 10 min para lavar el tejido, después se realizaron 3 colectas de 5 min cada una para las cuatro vías. Posteriormente, en las vías 2, 3 y 4 se perfundieron con medios que contenían las diferentes drogas recolectando 5 muestras de 5 min cada una, al término de las cuales se sustituyó nuevamente al medio basal y se realizaron 5 colectas adicionales de 5 min. La vía 1 se mantuvo durante todo el tiempo con medio normal, tomando la liberación obtenida de esta vía como liberación basal.

Las fracciones se colectaron en viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo, lo mismo que el filtro con el tejido para cuantificar la radiactividad en un contador de centelleo líquido Beckman modelo LS6000.

La liberación se calculó en porcentaje de cada fracción, de la siguiente forma:

$$\% \text{ Liberación} = \frac{\text{Radiactividad liberada en 5 min}}{\text{Radiactividad total} * } \times 100$$

(\*) Radiactividad del filtro + Radiactividad de las fracciones.

Los resultados se expresaron en sobreflujo, de la fracción con mayor liberación.

#### *Análisis estadístico*

Los resultados se analizaron por medio de la prueba de t de student de dos colas, y la ANOVA de una cola. La significancia estadística que se consideró fue de una \* $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.05$ .

# *RESULTADOS*

### **Captación de DA-[<sup>3</sup>H]**

Los resultados muestran que la L-Arg a concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{M}$  no modificó significativamente la captura de DA-[<sup>3</sup>H] en rebanadas del cuerpo estriado respecto al control (Figura 7). Sin embargo, la Nitro-Arg aplicada en las mismas concentraciones reduce la captura de DA-[<sup>3</sup>H] en 33% y 41% respectivamente (Figura 7). En tanto que la combinación de L-Arg y Nitro-Arg a concentración de 10 y 100  $\mu\text{M}$  induce una inhibición del 23% y 44% en la captación de DA-[<sup>3</sup>H] respecto al testigo (Figura 7).

### **Liberación de DA-[<sup>3</sup>H]**

Los resultados de liberación muestran que los agonistas de los R-Glu inducen un incremento diferencial sobre la liberación espontánea de DA-[<sup>3</sup>H] en rebanadas del cuerpo estriado. Así, la aplicación de NMDA, KA y Quiscualato en una concentración de 10 $\mu\text{M}$  eleva la liberación en un 97, 77 y 15% respectivamente, en comparación con la liberación basal del transmisor (Figura 8, 9 y 10). Sin embargo, la presencia de la Nitro-Arg (inhibidor de la síntesis de ON) y el MK-801 (antagonista del receptor a NMDA), en forma independiente reducen la liberación de DA-[<sup>3</sup>H] respecto al valor basal (Figura 8).

Al igual que los antagonistas de Glu, la L-Arg (10 $\mu\text{M}$ ) ejerció un efecto estimulatorio sobre esta liberación. Sin embargo, el efecto fue de mayor intensidad, pues la liberación de DA-[<sup>3</sup>H] se incrementó hasta un 228% respecto al valor basal. La aplicación de Nitro-Arg (10 $\mu\text{M}$ ) revirtió parcialmente, pero de manera significativa el efecto de la L-Arg (Figura 8).

La combinación de NMDA + L-Arg no potenció el efecto producido por el agonista solo. Aún así la Nitro-Arg (10 $\mu\text{M}$ ) inhibió el efecto excitatorio del NMDA, lo mismo que su antagonista el MK-801 (10 $\mu\text{M}$ ) (Figura 8).

Por otro lado, la L-Arg potenció el efecto estimuladorio del KA, al incrementar la liberación hasta en un 109%. Esta estimulación fue disminuida significativamente por Nitro-Arg y GAMS (10 $\mu$ M) (Figura 9).

Finalmente, aunque el efecto del Quiscalato sobre la liberación de DA-[<sup>3</sup>H] fue pequeño su combinación con L-Arg incrementó esta liberación hasta en 48%. Mientras que la combinación Quiscalato + Nitro-Arg ejerció una inhibición significativa de la liberación de DA-[<sup>3</sup>H] estriatal (Figura 10).

# *DISCUSSION*

La caracterización de diferentes sistemas de transmisores y sus mecanismos de regulación en el estriado, tienen especial atención debido a las implicaciones que esta región cerebral posee en diversas enfermedades neurodegenerativas (48,72), por esta razón, en el presente trabajo se desarrollaron experimentos con el propósito de profundizar en el conocimiento respecto a la regulación del transporte de DA en el estriado como una de las aferencias más importantes de esta área.

Los resultados obtenidos demuestran que NMDA, Kainato y L-Arg estimulan la liberación espontánea de DA-[<sup>3</sup>H] en el cuerpo estriado de la rata, efectos que se reducen en presencia de MK-801, GAMS y Nitro-Arg. Además, los resultados también permiten observar que la L-Arg y la Nitro-Arg modulan la captación de DA-[<sup>3</sup>H] incrementándola y disminuyéndola, respectivamente. Lo anterior sugiere que posiblemente exista una vía enzimática para la formación de ON que participe en la regulación del transporte de DA en el cuerpo estriado, con fuertes evidencias de que este proceso se desarrolla vía activación de algunos R-Glu, particularmente los R-NMDA y R-Kainato (32,66). Los efectos de la transmisión Gluérgica sobre el transporte de DA sugieren que la regulación axo-axónica existente entre terminales DAérgicas y Gluérgicas, depende de la presencia de R-Glu sobre terminales nerviosas DAérgicas (73,74).

La síntesis de ON en el estriado, podría estar implicada en los mecanismos de regulación de la liberación de neurotransmisores, de manera semejante a lo que se ha propuesto para el hipocampo, donde el ON recién sintetizado por activación de receptores a Glu difunde rápidamente hacia el tejido neuronal circunvecino para estimular terminales Gluérgicas y potenciar la liberación de este neurotransmisor (28). Esto nos lleva a proponer que si la síntesis de ON en el estriado, es una consecuencia de la apertura de canales ligados a receptores a Glu, el

transporte de DA podría estar regulado en forma importante por las sinápsis Gluérgicas, mientras que la concentración de DA extracelular podría determinar en algún momento la distribución de la actividad sináptica excitatoria y la formación de ON como respuesta a ésta. Por lo tanto las fibras cortico-estriatales y aferencias negro-estriatales que terminan en el estriado podrían establecer una regulación presináptica mútua sobre el transporte de sus respectivos transmisores y contribuir a mantener un balance sobre sus células blanco (73,48).

Aunque la mayoría de las evidencias experimentales apoyan la idea de que el ON ejerce sus efectos a través de la potenciación de la liberación de Glu actuando como un retromensajero sobre la terminal presináptica (28), no se debe de descartar la posibilidad de que este ON pueda actuar sobre el mismo R-NMDA postsináptico a nivel del sitio redox, ya que se ha demostrado que análogos del ON son capaces de favorecer la formación de puentes disulfuro en este sitio a través de la formación de radicales nitrosotioles, lo cual parece regular la activación de este receptor (23).

Las observaciones de que la inducción del PLT es un fenómeno dependiente de la activación del R-NMDA (27,75) y de la producción de ON (76,77), han llevado a proponer que la activación del sistema ONS es una consecuencia de la entrada de  $Ca^{++}$  producida por la activación de este receptor (27). Sin embargo, la activación del R-Kainato, también induce un incremento de la permeabilidad a  $Ca^{++}$ , lo que posiblemente también pudiera activar el sistema de síntesis del ON (78). Esta posibilidad se apoya con los resultados obtenidos, los cuales permiten observar que la producción de ON realmente está implicada en el mecanismo de regulación ejercido por el KA sobre la liberación de DA.



Existen dos hipótesis para explicar la implicación de los R-NMDA y R-Kainato en la producción de ON, donde se propone por un lado, la posible asociación de una subunidad del R-NMDA con subunidades del R-Kainato implicadas en la producción del ON; mientras que una segunda posibilidad es que una familia del R-Glu ionotrópico no identificada, posee una secuencia con alto grado de homología entre las subunidades del R-NMDA y la subunidades del R-Kainato (77), lo que podría propiciar resultados semejantes para los agonistas de ambos tipos de R-Glu.

La existencia de un sitio sensible a poliaminas en el R-NMDA (21) lleva a proponer que posiblemente el alto efecto potenciador de la L-Arg sobre la liberación de DA no sea debido únicamente a la producción de ON, sino a que también pudiera actuar como poliamina sobre este sitio. Sin embargo, este efecto potenciador no se observa cuando la L-Arg se aplica en combinación con alguno de los agonistas de Glu, debido probablemente a que la despolarización celular inducida por estos agonistas produce cambios conformacionales que dificultan la interacción de la L-Arg con el R-NMDA.

Por otro lado, la síntesis y liberación de DA pueden ser reguladas por otros sistemas de neurotransmisión que convergen en el estriado, tal es el caso del sistema colinérgico el cual se ha demostrado que ejerce diferentes efectos de modulación sobre la liberación de DA (48,79). También existen evidencias de que los receptores a GABA están asociados con terminales DAérgicas estriatales, y se ha propuesto que posiblemente el GABA module la liberación de DA a través de mecanismos directos vía activación de receptores a GABA (48), aunque no se descarta una vía indirecta, dada la complejidad de las interacciones entre neuronas GABAérgicas y terminales DAérgicas en el estriado (80).

Además, se ha propuesto que la regulación de la liberación de DA en el estriado también está regulada por la activación diferencial de sus receptores  $D_1$  y  $D_2$  (81,82), éstos se encuentran localizados tanto sobre terminales nerviosas DAérgicas como Gluérgicas y se consideran reguladores de la síntesis de DA (83). En este sentido, estudios recientes han demostrado que la síntesis de DA es modulada diferencialmente por AMPA/Kainato y NMDA, atribuyendo estos efectos a la activación de los  $R-D_2$  y  $R-D_1$  localizados sobre las terminales Gluérgicas (84).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto y con los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible vislumbrar algunas de las implicaciones y el significado que podría tener un aumento en la formación de ON en esta región por una estimulación excesiva de R-Glu. Sin embargo, no se ha esclarecido aún el grado de vulnerabilidad de algunas células de tipo colinérgico o GABAérgico en el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas (Corea de Huntington, Alzheimer, etc.) ni su relación con un incremento en el transporte de DA, por lo que será necesario continuar en la búsqueda y diseño de experimentos adicionales para profundizar y ampliar el conocimiento al respecto.

# *CONCLUSIONES*

La producción de ON influye sobre el transporte de DA al incrementar tanto la liberación como la captación de este neurotransmisor en rebanadas del cuerpo estriado.

El efecto estimulador de los agonistas de Glu, el NMDA y el KA, sobre la liberación de DA, parece estar mediado por la producción de ON, lo que sugiere que es la activación de esos receptores (R-NMDA y R-Kainato) la que está implicada en la activación del sistema ONS.

La L-arginina ejerce un efecto estimulador superior sobre la liberación de DA en comparación al que ejercen los agonistas de Glu, debido posiblemente a que además de promover la síntesis de ON esté interactuando con el sitio sensible a poliaminas del R-NMDA.

El incremento en el recambio de DA por activación de los R-Glu puede ser uno de los mecanismos implicados en el daño excitotóxico producido por los agonistas de Glu en el estriado, el cual podría influir sobre la vulnerabilidad de otros sistemas de neurotransmisión que convergen en esta región cerebral.

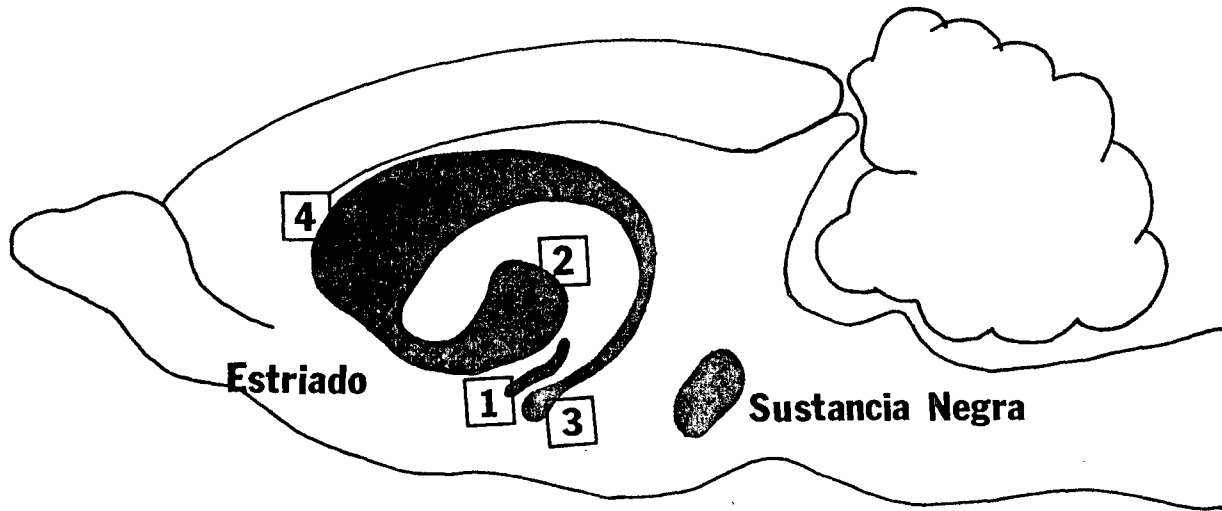
# *FIGURAS*

FIGURA 1  
**Ubicación neuroanatómica del cuerpo Estriado**

En un corte anteroposterior de los hemisferios cerebrales se muestran los ganglios basales:

1. Claustrum
2. Núcleo Lenticular
3. Núcleo Amígdalino
4. Núcleo Caudado

Los tres últimos constituyen el cuerpo estriado.



## FIGURA 2

**Principales conexiones y sistemas de neurotransmisión  
del cuerpo estriado**

1. Conexión cortico-estriatal (Gluérgica)
2. Conexión tálamo-estriatal (Gluérgica)
3. Conexión negro-estriatal (DAérgica)
4. Proyección estriato-palidal (GABAérgica)
5. Proyección estriato-talámica (Gluérgica)
6. Proyección estriato-negral (GABAérgica)
7. Interneuronas colinérgicas



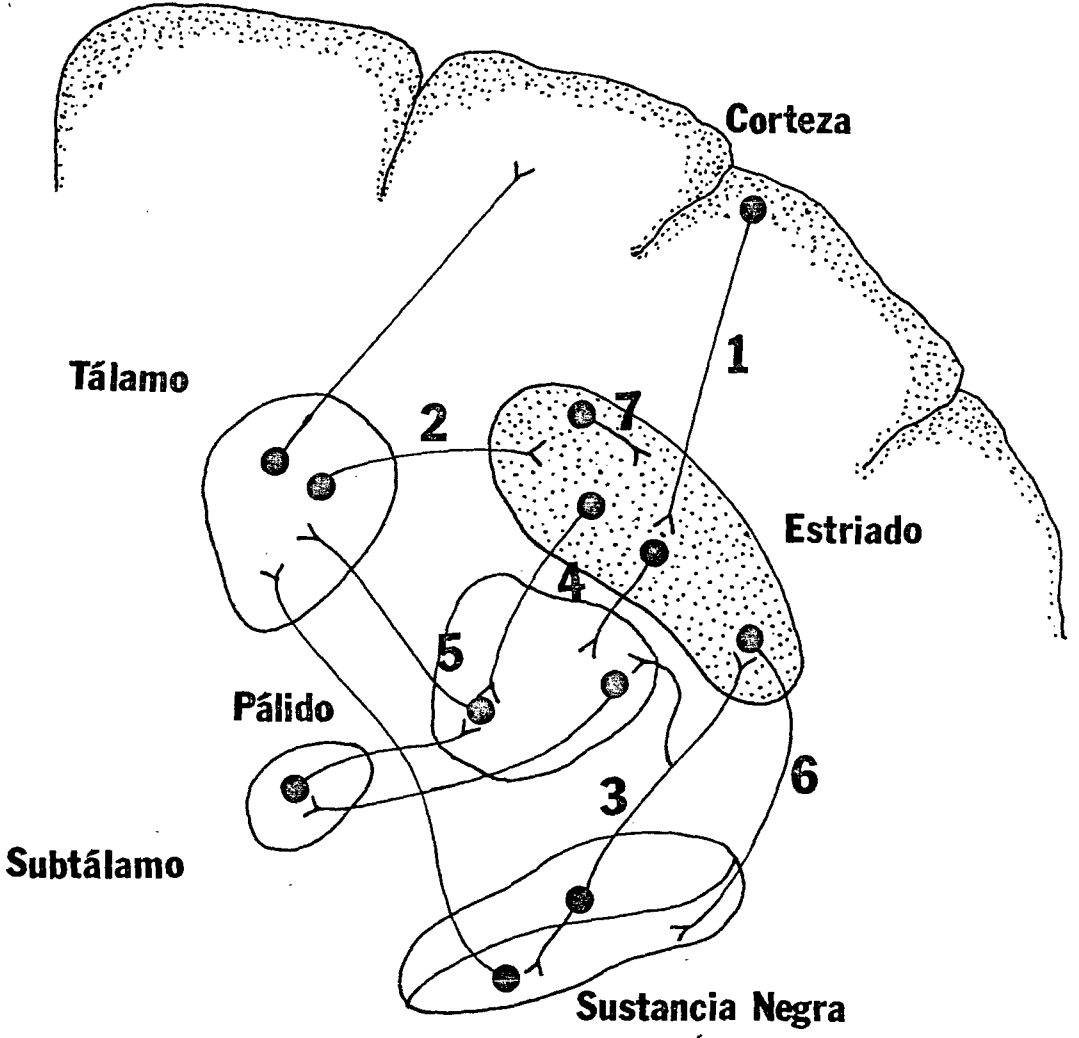


FIGURA 3  
**Principales Vías DAérgicas**

La principal vía DAérgica se origina en la región compacta de la sustancia negra (SN) y proporciona inervación hacia: Núcleo Acumbens (NA), Corteza Cingular Anterior (CCA), Corteza Frontal (CF), Tubérculo Olfatorio (TO), Eminencia Media (EM) y Cuerpo Estriado (CE).

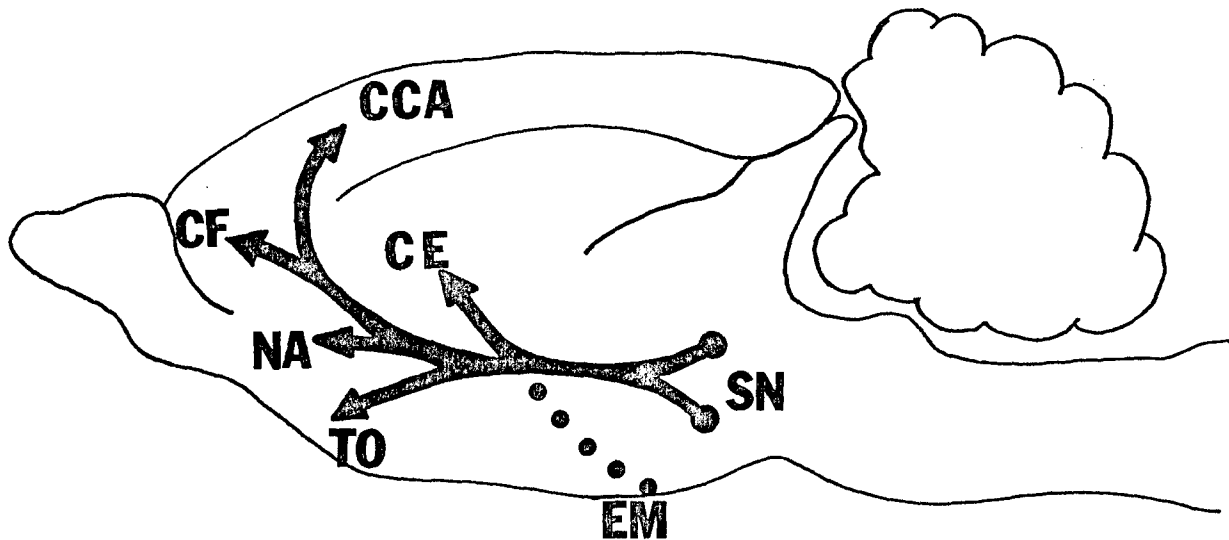
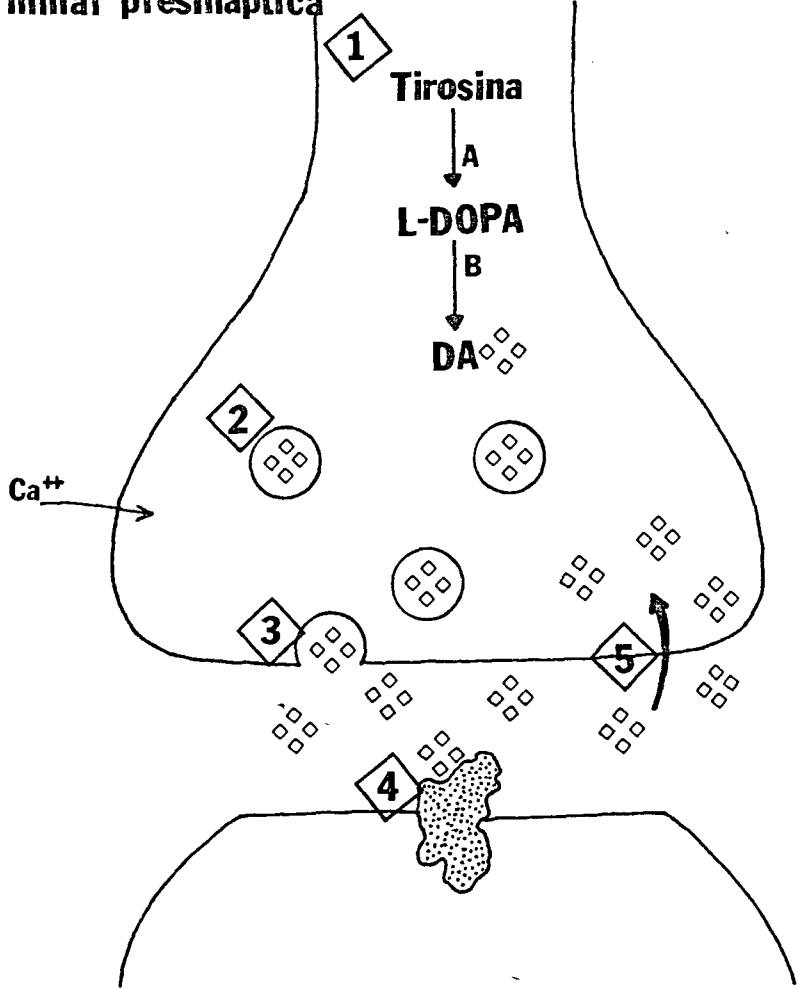


FIGURA 4  
**Sinápsis DAérgica**

1. Síntesis:   A) Tirosina Hidroxilasa  
              B) Descarboxilasa de aminoácidos  
                  aromáticos
2. Vesiculación
3. Liberación dependiente de  $Ca^{++}$
4. Interacción con el receptor
5. Eliminación del espacio intersináptico (Captación)

**Terminal presináptica**

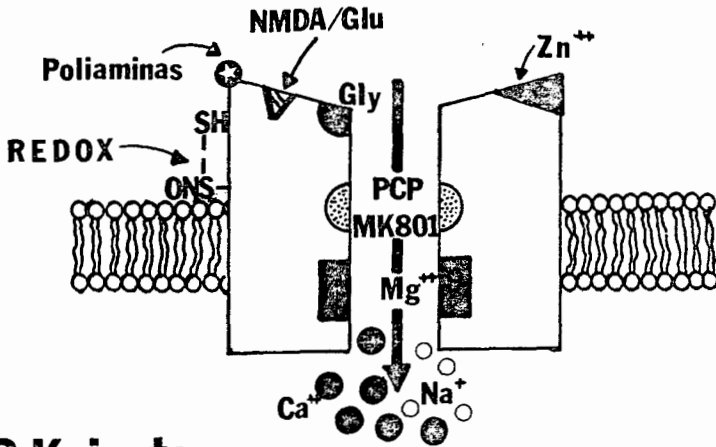


**CELULA  
POSTSINAPTICA**

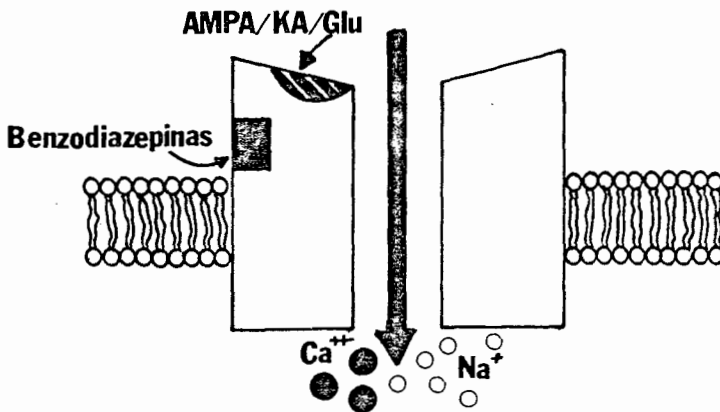
FIGURA 5  
Receptores Ionotrópicos a Glutamato

1. R-NMDA
2. R-Kainato
3. R-Quiscualato

# 1. R-NMDA



# 2. R-Kainato



# 3. R-Quiscualato

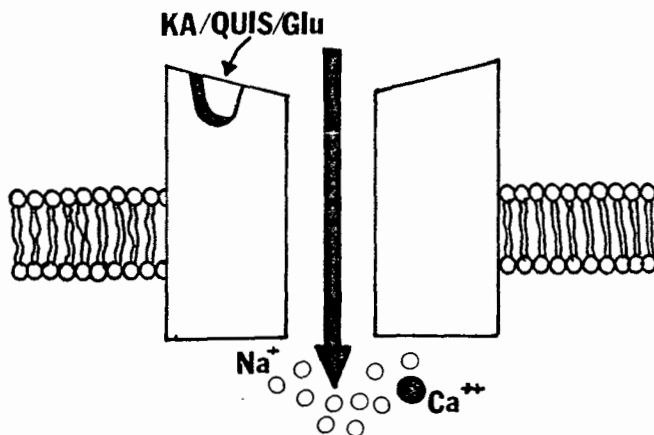
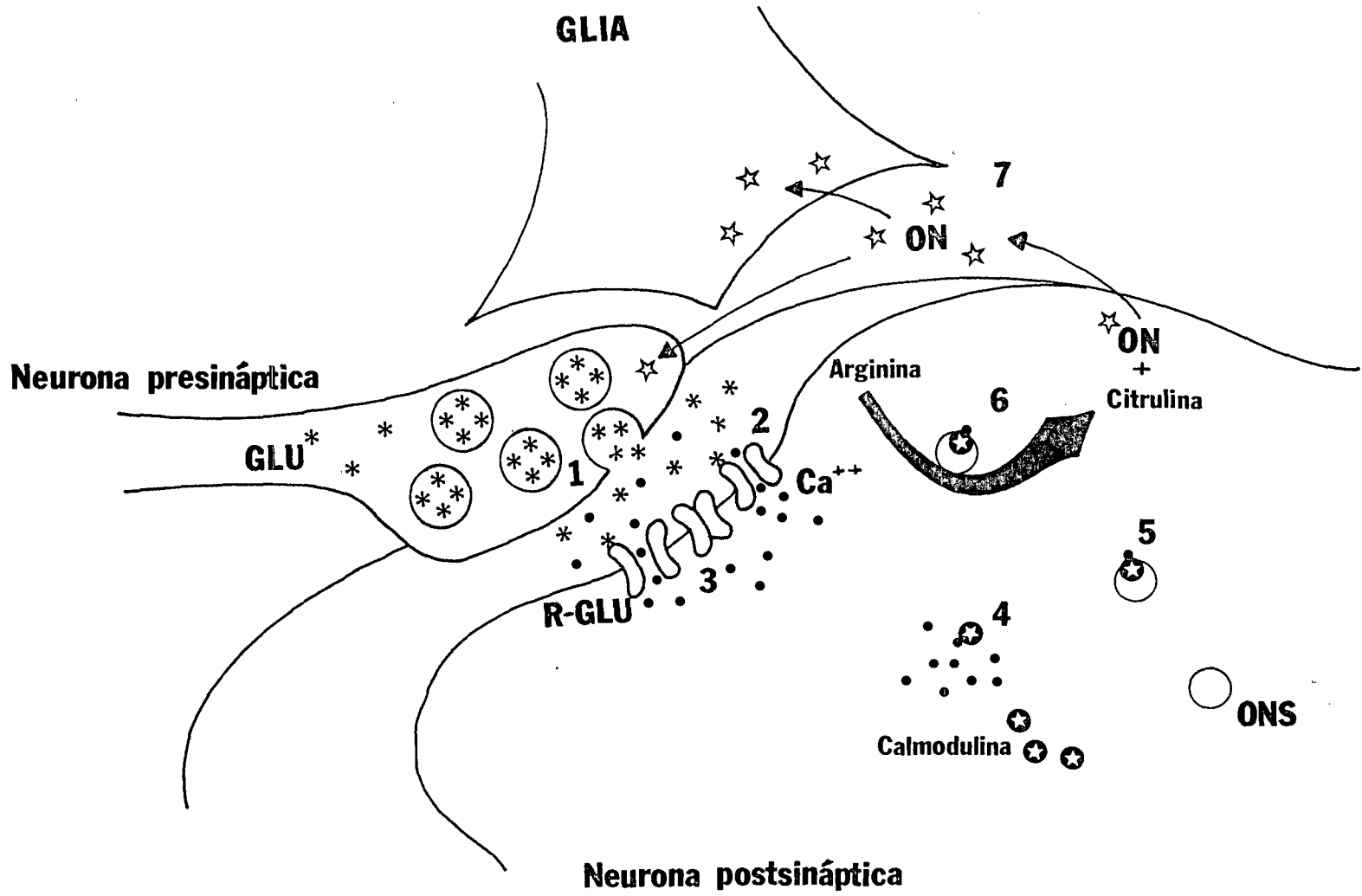


FIGURA 6  
Síntesis de Oxido Nítrico (ON)

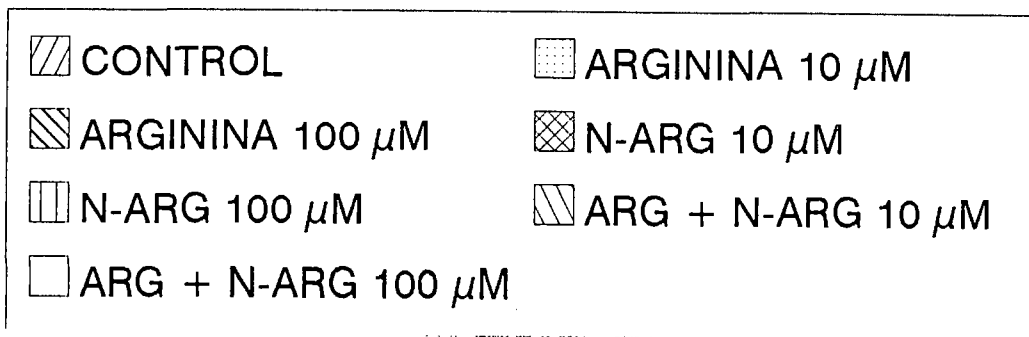
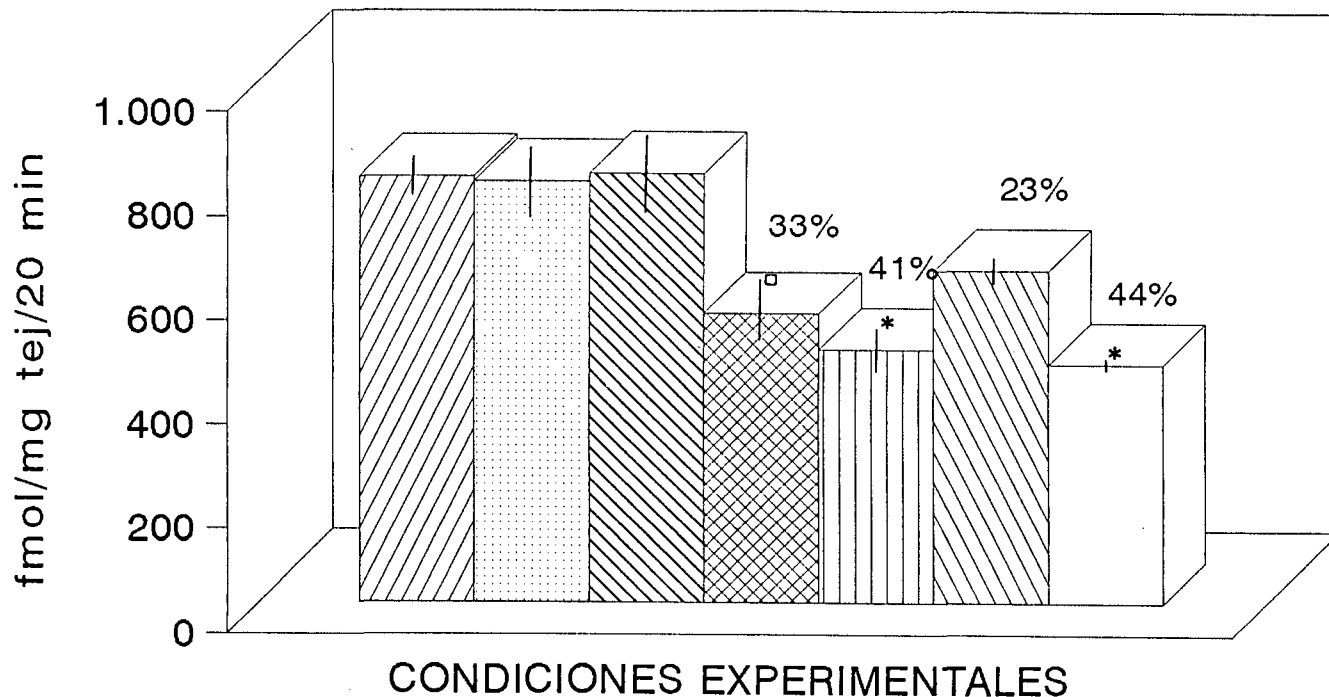
1. Liberación de Glu
2. Activación de R-Glu postsináptico
3. Entrada de  $Ca^{++}$  a la terminal postsináptica
4. Formación del complejo  $Ca^{++}$ -Calmodulina
5. Activación de la ONS
6. Síntesis de ON
7. Difusión del ON a elementos neuronales circunvecinos





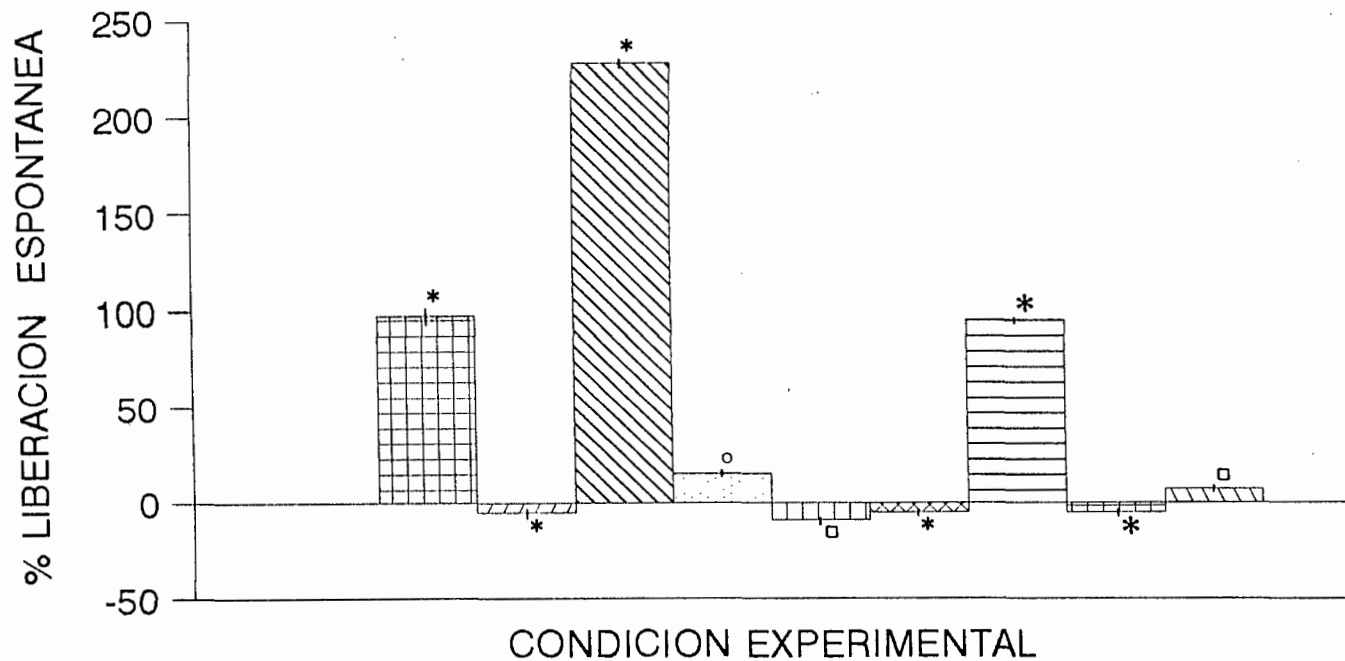
## FIGURA 7

Efecto de L-Arg y Nitro-Arg (10 y 100  $\mu$ M), sobre la captación de DA-[ $^3$ H] en rebanadas estriatales. Los resultados expresan  $\bar{x} \pm$  ESM de 4 experimentos por duplicado. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo fueron: \* $P < 0.001$ ,  $\square P < 0.05$  y  $\circ P < 0.01$ .



## FIGURA 8

Liberación DA- $^3\text{H}$  en rebanadas estriatales en presencia de NMDA, MK-801, L-Arg y Nitro-Arg a una concentración de  $10\ \mu\text{M}$ . Los resultados representan la  $\bar{x} \pm \text{ESM}$  con respecto al valor basal (0%) de 6 experimentos. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo fueron: \* $P < 0.001$ ,  $\square P < 0.05$  y  $\circ P < 0.01$ .



□ BASAL

▨ L-ARG 10  $\mu$ M

▩ NMDA+NITRO-ARG 10  $\mu$ M

▧ L-ARG+NITRO-ARG 10  $\mu$ M

▣ NMDA 10  $\mu$ M

▤ NITRO-ARG 10  $\mu$ M

▥ NMDA+L-ARG 10  $\mu$ M

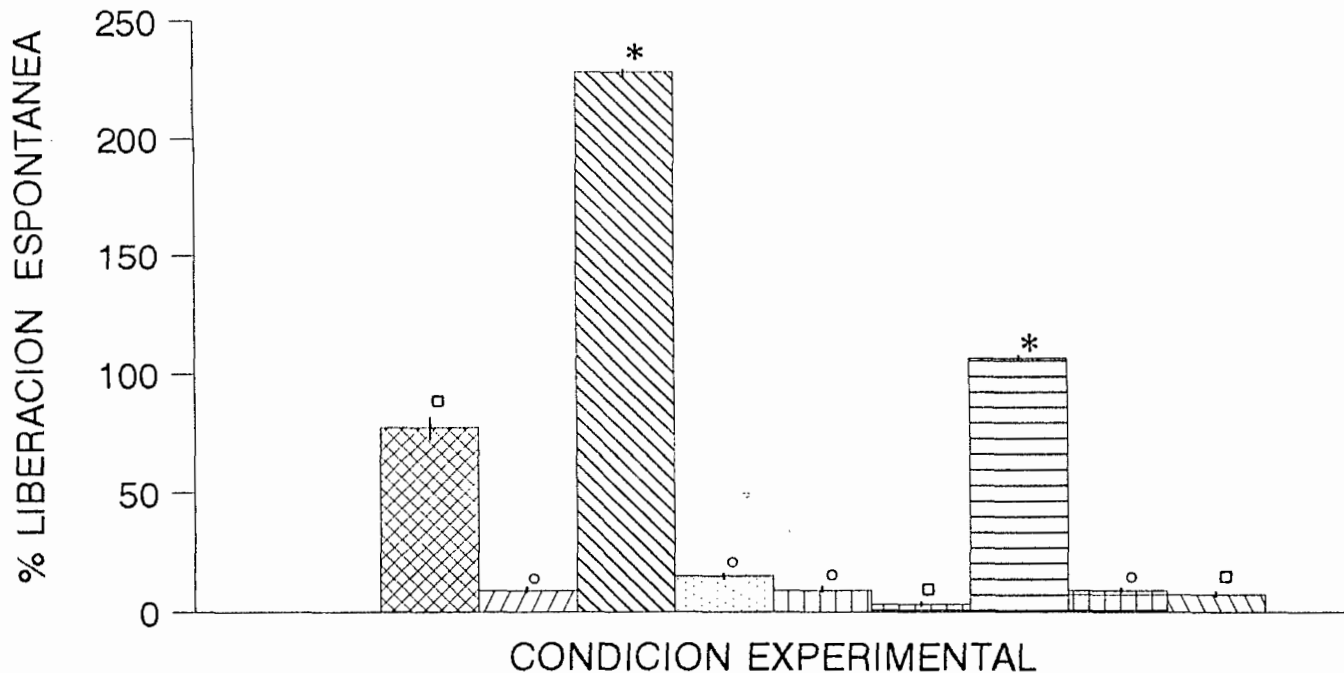
▦ MK-801 10  $\mu$ M

▨ NMDA+MK-801 10  $\mu$ M

▩ L-ARG+MK-801 10  $\mu$ M

## FIGURA 9

Efecto del Kainato, GAMS, L-Arg y Nitro-Arg a una concentración de 10  $\mu$ M sobre la liberación de DA-[ $^3$ H] en rebanadas estriatales. Los resultados representan la  $\bar{x} \pm$  ESM con respecto al valor basal (0%) de 6 experimentos. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo fueron: \* $P < 0.001$ ,  $\square P < 0.05$  y  $\circ P < 0.01$ .



□ BASAL

▧ L-ARG 10 μM

▨ KAINATO+NITRO-ARG 10 μM

▩ L-ARG+NITRO-ARG 10 μM

▤ KAINATO 10 μM

▥ NITRO-ARG 10 μM

▦ KAINATO+L-ARG 10 μM

▧ GAMS 10 μM

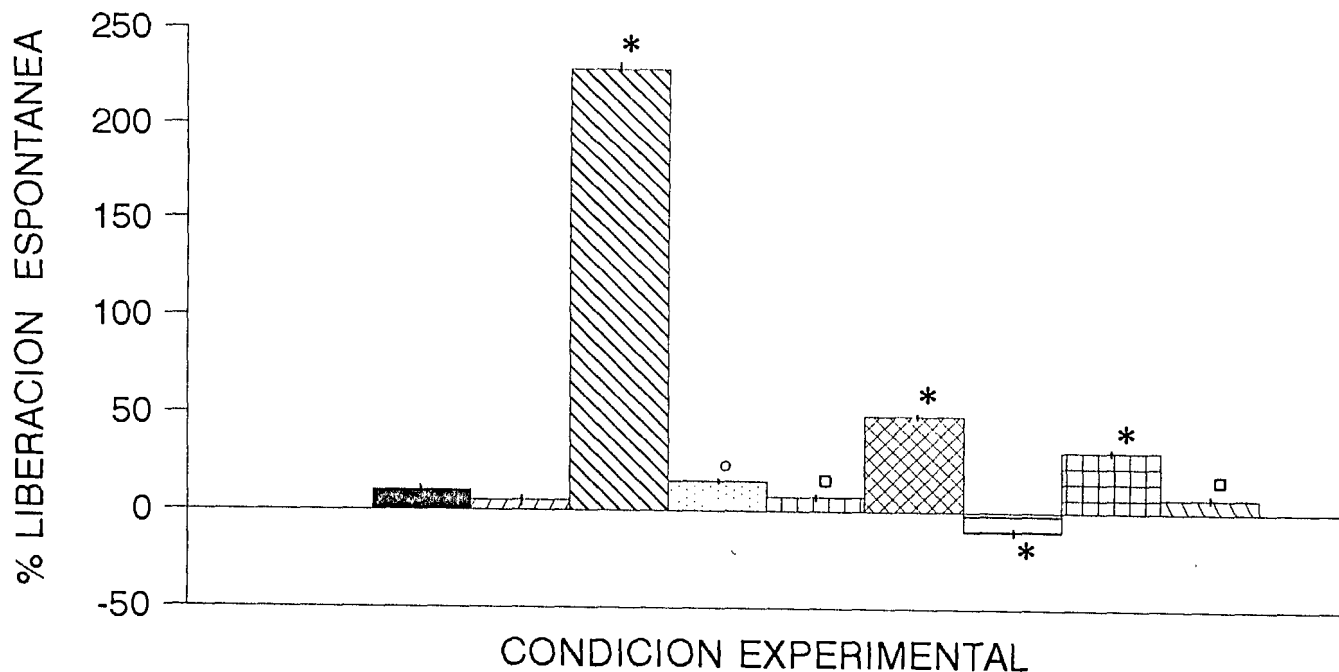
▨ KAINATO+GAMS 10 μM

▩ L-ARG+GAMS 10 μM

## FIGURA 10

Liberación de DA- $^3\text{H}$  en rebanadas estriatales en presencia de Quiscualato, CNQX, L-Arg y Nitro-Arg a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Los resultados representan la  $\bar{x} \pm \text{ESM}$  con respecto al valor basal (0%) de 6 experimentos. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo fueron: \* $P < 0.001$ ,  $\square P < 0.05$  y  $\circ P < 0.01$ .





□ BASAL

▨ L-ARG 10 μM

▩ QUIS+L-ARG 10 μM

▧ L-ARG+NITRO-ARG 10 μM

■ QUISCUALATO 10 μM

▨ NITRO-ARG 10 μM

▩ QUIS+NITRO-ARG 10 μM

▨ CNQX 10 μM

▩ QUIS+CNQX 10 μM

▩ L-ARG+CNQX 10 μM

# *BIBLIOGRAFIA*

- 1.-**López Antúnez L.** (1983). Anatomía funcional del Sistema Nervioso. MEXICO. LIMUSA.
- 2.- **Noback C.R. y Demarest W.M.** (1956). A study of thalamo-striate relations in the monkey. *Brain* 79: 1296-1297.
- 3.-**Kravitz E.A., Kuffler, S.W., Potter D.D. y col.** (1963). Gamma-amino-butyric acid and other blocking compounds in Crustacea II. Pheripheral nervous system. *J. Neurophysiol.* 26: 729-738.
- 4.-**Powell T.P.S. y Cowan W.M.** (1956). A study of thalamo-striate relations in the monkey. *Brain.* 79: 1296-1297.
- 5.-**Andén N.E., Dahlström A., Fuxe N. y col.** (1965). Further evidence for the presence of nigro-neostriatal dopamine neurons in the rat. *Amer. J. Anat.* 116: 329-337.
- 6.-**Woodburne P.T., Crosby E.C. y Mc Cutter R.E.** (1946). The mammalian midbrain and isthmus regions. Part II. The fiber connections. A.The relations of the tegmentum of the midbrain with the basal ganglia in *Macaca mulatta*. *J.Comp.Neur.* 85: 67-92.
- 7.- **Szabo J.** (1968). Efferent projections from the body of the caudate nucleus. *Anat. Rec.* 160: 437.
- 8.-**Cowan W.M. y Powell T.P.S.** (1966). Striopallidal projection in the monkey. *J. Neurol. Psychiat.* 28: 137-151.
- 9.- **Gerfen Ch.R.** (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *TINS* 15(4): 133-139.
- 10.- **Glowinski J.** (1970). Storage and release of monoamines in the central nervous system. En: *Handbook of Neurochemistry.* Plenum Press. p.p. 91-111.
- 11.- **Carlsson A.** (1959). The ocurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev.* 11: 490-493.
- 12.-**Bédard P., Larochele l., Parent A. y Poirier L.** (1969). The nigrostriatal pathway: A correlative study based on neuroanatomical and neurochemical criteria in the cat. *Exp. Neurol.* 25:365-377.
- 13.-**Bertler A., Falck B., Gottfries C.G. y col.** (1964). Some observations on adrenergic connections between mesencephalon and cerebral hemispheres. *Acta Pharmacol.* 21: 283-289.
- 14.-**Llinás R. y Nicholson C.** (1975). Calcium role in depolarization secretion coupling: An aequorium study in

squid gigant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 187-190.

15.-Fuller R.W. (1993) Biogenic amine transporters. *Neurotransmissions IX*(2):1.

16.-Kandel E.R. (1981). Synaptic Transmission II. Presynaptic factors controlling transmitters release. En: *Principles of Neural Science*. p.p. 81-90.

17.-Halaris A.E. y DeMet E.M. (1978). Active uptake of [<sup>3</sup>H]-5HT by synaptic vesicles from rat brain. *J. Neurochem.* 31: 591-597.

18.-Rothman S.M. y Olney J.W. (1986). Glutamate and the pathophysiology of hipoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol.* 19: 105-111.

19.-Bowyer J.F., Newport G.D. Lipe G.W. y Frame L.T. (1992). A further evaluation of the effects of K<sup>+</sup> depolarization on gluta-mate-evoked [<sup>3</sup>H]-dopamine release from striatal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261(1): 72-80.

20.-Demerlé-Pallardy C., Lonchamp M-O., Chabrier P-E y Braquet P. (1991). Absence of implication of L-arginine/nitric oxide pathway on neuronal cell injury induced by L-glutamate or hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181 (1): 456-464.

21.-Gasic G.P. y Hollman M. (1992). Molecular Neurobiology of Glutamate Receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 507-536.

22.-Coyle J.T. y Puttfarcken P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695.

23.-Lipton S.A. y Rosenberg P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England Journal of Medicine.* 330(9): 613-622.

24.-Pai K.S., y Ravindranath V. (1992). Quisqualic acid-induced neurotoxicity is protected by NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Neurosci. Lett.* 143: 177-180.

25.-Meldrum B. y Garthwaite J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *TIPS.* 11: 379-387.

26.-Iadecola C. (1993). Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link?. *TINS* 16(6): 206-214.

27.-Stamler J.S., Singel D.J. y Loscalzo J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.

- 28.-**Blackstone C.G.** (1992). Excitatory amino acids and protein kinases. *Neuroscience Facts*. 3 (11): 1 y 3.
- 29.-**Snyder S.H. y Bredt D.S.** (1992). Biological Roles of nitric oxide. *Scientific American* 28-35.
- 30.-**Buisson A., Margaille I., Callebert J., y col.** (1993). Mechanisms involved in the neuroprotective activity of a nitric oxide synthase inhibitor during focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 61: 690-696.
- 31.-**Garthwaite J.** (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *TINS* 14(2): 60-67.
- 32.-**Hanbauer I., Wink D., Osawa Y. y col.** (1992). Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [<sup>3</sup>H]-dopamine from striatal slices. *Neuroreport* 3(5): 409-412.
- 33.-**Maiese K., Boniece I., DeMeo D. y Wagner A.** (1993). Peptide growth factors protect against ischemia in culture by preventing nitric oxide toxicity. *J. Neurosci.* 13(7): 3034-3040.
- 34.-**Dawson V.L., Dawson T.M., London E.D. y col.** (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 6368-6371.
- 35.-**Puttfarcken P.S., Lyons W.E. y Coyle J.T.** (1992). Dissociation of nitric oxide generation and kainate-mediated neuronal degeneration in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 31 (6): 565-575.
- 36.-**Dugan L.L., Choi D.** (1994). Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann. Neurol.* 35: S17-S21.
- 37.-**Moncada S.M.D. y Higgs A.M.** (1993). The L-arginine nitric oxide pathway. *The New Eng. J. Med.* 329 (27): 2002-2012.
- 38.-**Walder C.E., Thiemermann C. y Vane J.R.** (1991). The involvement of endothelium-derived relaxing factor in the regulation of renal cortical blood flow in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 102: 967-973.
- 39.-**Malenka R.C. y Nicoll R.A.** (1993). NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *TINS* 16(12): 521-526.
- 40.-**Kiedrowski L., Costa E. y Wroblewski J.Y.** (1992). *In vitro* interaction between cerebellar astrocytes and granule cells: a putative role for nitric oxide. *Neurosci. Lett.* 135: 59-61.

- 41.-Kiedrowski L., Costa E. y Wroblewski J.T. (1992). Glutamate receptor agonist stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 58: 335-341.
- 42.-Teichberg V.I. (1991). Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. *FASEB J.* 5: 3086-3091.
- 43.-Johnson K.M. y Jeng Y-J. (1991). Pharmacological evidence for N-methyl-D-aspartate receptors on nigrostriatal dopaminergic nerve terminals. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69: 1416-1421.
- 44.-Jacocks III H.M. y Cox B.M. (1992). Serotonin-stimulated release of [<sup>3</sup>H]-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 D-amphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 262 (1): 356-364.
- 45.-Yamamoto B.K. y Davy S. (1992). Dopaminergic modulation of glutamate release in striatum as measured by microdialysis. *J. Neurochem.* 58: 1736-1742.
- 46.-Gandolfi O., Rimondini R. y Dall'Olio R. (1992). The modulation of dopaminergic transmission in the striatum by MK-801 is independent of presynaptic mechanisms. *Neuropharmacology* 31 (11): 1111-1114.
- 47.-Böhme G.A., Bon C., Stutzmann J-M. y col. (1991). Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 379-381.
- 48.-Chesselet M.F. (1984). Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: Facts and hypothesis. *Neuroscience* 12(2): 347-375.
- 49.-Ennis C. y Cox B. (1981). GABA enhancement of [<sup>3</sup>H]-dopamine release from slices of rat striatum: dependence on slice size. *Eur. J. Pharmacol.* 70: 417-420.
- 50.-Reiman W., Zumstein A., Y Starke K. (1982).  $\tau$ -aminobutyric acid can both inhibit and facilitate of the rabbit. *J. Neurochem.* 39: 961-969.
- 51.-Giurguieff-Chesselet M.F., Kemel M.L. Wandscher D. y col. (1979). Glycine stimulates the spontaneous release of newly synthesized [<sup>3</sup>H]-dopamine in rat striatal slices. *Eur. J. Pharmacol.* 60: 101-104.
- 52.-Westfall T.C. (1982). Inhibition of the electrically induced release of [<sup>3</sup>H]-dopamine and serotonin from superfused rat striatal slices. *Neurosci.Lett.* 28:205-209.

- 53.-Reisine T.D., Chesselet M.F., Lubetzki C. y col. (1982). A role from striatal beta-adrenergic receptors in the regulation of dopamine release. *Brain Research*. 241: 123-130.
- 54.-Roberts P.J. and Sharif N.A. (1978). Efeccts of L-glutamate and related amino-acids upon the release of [<sup>3</sup>H]-dopamine from rat striatal slice. *Brain Research*. 157: 391-395.
- 55.-Desce J.M., Godeheu G., Galli T. y col. (1991). Presynaptic facilitation of dopamine release through D, L- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptors on synaptosomes from the rat striatum. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* 259 (2): 692-698.
- 56.-Krebs M-O., Trovero F., Desban M. y col. (1991). Distinct presynaptic regulation of dopamine release through NMDA receptors in striosome- and matrix-enriched areas of the rat striatum. *J. Neurosci.* 11 (5): 1256-1262.
- 57.-Carlsson M. y Carlsson A. (1990). Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *TINS* 13(7): 272-276.
- 58.-Leviel V., Gobert A. y Guibert B. (1990). The glutamate-mediated release of dopamine in the rat striatum: further characterization of the dual excitatory-inhibitory function. *Neuroscience* 39(2): 305-312.
- 59.-Krebs M.O., Desce J.M., Kemel M.L. y col. (1991). Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum: Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals. *J. Neurochem.* 56: 81-85.
- 60.-Overton P. y Clark D. (1991). N-methyl-D-aspartate increases the excitability of nigrostriatal dopamine terminals. *Eur. J. Pharmacol.* 201: 117-120.
- 61.-Samuel D., Errami M. y Nieoullon A. (1990). Localization of N-methyl-D-Aspartate receptors in the rat striatum: Effects of specific lesions on the [<sup>3</sup>H] 3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-Phosphonic acid binding. *J. Neurochem.* 54: 1926-1933.
- 62.-Fuller R.W., Hemrick-Luecke S.K. Y Ornstein P.L. (1992). Protection against amphetamine-induced neurotoxicity toward striatal dopamine neurons in rodents by LY274624, an excitatory amino acid antagonist. *Neuropharmacology* 31 (10): 1027-1032.
- 63.-Dawson V.L., Dawson T.M., Bartley D.A., y col. (1993). Mechanism of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.* 13(6): 2651-2661.

- 64.-**Moncada S., Palmer R.M.J. y Higgs A.** (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *Biochem. Pharmacol.* 38(11):1709-1715.
- 65.- **Rothman S.M y Olney J.W.** (1987). Excitotoxicity and the NMDA receptor. *TINS* 10(7): 299-302.
- 66.-**Garthwaite J., Garthwaite G., Palmer R.M.J. y Moncada S.** (1989) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *European Journal of Pharmacology-Molecular Pharmacology Section* 172: 413-416.
- 67.-**Dwyer M.A., Bredt D.S. y Snyder S.H.** (1991). Nitric oxide synthase: irreversible inhibition by L-NG-nitroarginine in brain *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 176 (3): 1136-1141.
- 68.-**Schuman E.M. y Madison D.** (1991). A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254: 1503-1506.
- 69.-**MacIntyre I., Zaidi M., Towhidul A. y col.** (1991). Osteoclastic inhibition: An action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2936-2940.
- 70.-**Heikilla R.E., y Orlansky H. y Cohen G.** (1975). Studies on the distinction between uptake inhibitions and release of [<sup>3</sup>H]dopamine in rat brain tissue slices. *Biochem. Pharmacol.* 24: 847-852.
- 71.-**Beas-Zárate C., Schliebs R., Morales-Villagrán A., y Feria-Velazco A.** (1989). Mono-sodium L-glutamate induced convulsion changes in uptake and release of catecholamines in cerebral cortex and caudate nucleus of adult rats. *Epilepsy Res.* 4: 20-27.
- 72.-**Zigmond M.J., Abercrombie E.D., Berger T.W., y col.** (1990). Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *TINS.* 13:290-295.
- 73.-**Roberts P.J. y Anderson S.D.** (1979). Stimulatory effect of L-glutamate and related amino acids on [<sup>3</sup>H]dopamine release from rat striatum: an *in vitro* model for glutamate actions. *J. Neurochem.* 32: 1539-1545.
- 74.-**Roberts P.J. y Sharif N.A.** (1978). Effect of L-glutamate and related amino-acids upon the release [<sup>3</sup>H]dopamine from rat striatal slices. *Brain Research.* 157: 391-395.



- 75.-Vallebuona F. y Raiteri M. (1993). Monitoring of cyclic GMP during cerebellar microdialysis in freely-moving rats as an index of nitric oxide synthase activity. *Neuroscience* 57: 577-585.
- 76.- Schuman E.M. y Madison D.V. (1991). An inhibitor of nitric oxide synthetase prevents long-term potentiation (LTP). *Society for neuroscience abstracts* 17: p.2.
- 77.-Marin P., Quignard J-F., Lafon-Cazal M., y Bockaert J. (1993). Non-classial glutamate receptors, blocked by both NMDA and non-NMDA antagonists, stimulate nitric oxide production in neurons. *Neuropharmacology*. 32(1): 29-36.
- 78.-Garthwaite J., Southam E. y Anderton M. (1989). A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *Journal of Neurochemistry* 53: 1952-1954.
- 79.-Shimizu N., Duan S., Hori T. y Oomura Y. (1990). Glutamate modulates dopamine release in the striatum as measured by brain microdialysis. *Brain Research Bulletin* 25: 99-102.
- 80.-Chang R.S.L., Tran V.T. y Snyder S.H. (1980). Neurotransmitter receptor localizations. Brain lesion induced alterations in benzodiazepine, GABA,  $\beta$ -adrenergic and histamine-H1 receptor binding. *Brain Research*. 190: 85-110.
- 81.-Surmeier D.J., Eberwine J., Wilson C.J. y col. (1992). Dopamine receptor subtypes co-localize in rat striatonigral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 10178-10182.
- 82.-Cepeda C., Buchwald N.A., y Levine M.S. (1993). Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 9576-9580.
- 83.-Surmeier D.J. y Kitai S.T. (1994). Dopaminergic regulation of striatal efferent pathways. *Current Opinion in Neurobiology* 4: 915-919.
- 84.-Anja H.T. (1988). Synaptosomal dopamine autoreceptors: sensitivity changes after *in vitro* and *in vivo* treatments. *Pharmacol. Res. Commun.* 20(11): 1001-1011.