

03062

201 10.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS

PROFESIONAL Y DE POSGRADO

"ESTUDIOS "IN VITRO" E "IN VIVO" DE LA RELACION
DOPAMINA - GABA EN LOS GANGLIOS BASALES"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA EL

Q. JOSE VICTOR SEGOVIA VILA

1986

**TESIS CON
TALLA DE ORO**



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Se ha demostrado la existencia de una vía dopaminérgica nigro-estriatal así como la proyección de vías eferentes GABAérgicas del estriado hacia el globo pálido, núcleo entopeduncular y substantia nigra. Se han realizado numerosos experimentos conductuales que sugieren que las eferentes GABAérgicas del cuerpo estriado se encuentran relacionadas con la conducta motora dependiente de los receptores dopaminérgicos estriatales. La evidencia clínica parece apoyar esta hipótesis, ya que en varias enfermedades motoras se ve una alteración en estos neurotransmisores. Por otra parte, existen trabajos bioquímicos y farmacológicos, tanto "in vitro" como "in vivo" que han estudiado la relación entre la dopamina y el GABA. Estos aspectos se revisan en la Introducción.

En el presente trabajo se han estudiado las alteraciones en la actividad de la enzima sintetizadora del GABA, la GAD, y de la liberación "in vivo" de GABA en varias estructuras de los ganglios basales, como consecuencia de la denervación unilateral dopaminérgica del cuerpo estriado.

En estos experimentos, los sujetos, ratas blancas, fueron denervados por la inyección estereotáxica de la neurotoxina específica 6-hidroxi-dopamina en el haz del cerebro medio anterior. Se comprobó la denervación de los sujetos por la conducta de giro en respuesta a la inyección sistémica de apomorfina. Hubo dos tiempos de sobrevivencia de 4 y 8 semanas. La actividad de la enzima se midió "in vitro", empleando una técnica radiométrica. Para estudiar la liberación "in vivo" se usó la microdiálisis cerebral y cromatografía líquida.

Los resultados muestran, a las 4 semanas, un aumento en la actividad de la enzima en el cuerpo estriado, globo pálido y substantia nigra ipsilaterales a la lesión y una disminución en la actividad enzimática en el núcleo entopeduncular contralateral a la lesión. A las 8 semanas se vio una disminución en la actividad de la enzima en el cuerpo estriado y globo pálido y un marcado decremento en la substantia nigra ipsilaterales a la lesión. También se observó un decremento en la actividad en el globo pálido contralateral. La liberación de GABA "in vivo" se incrementó en el cuerpo estriado y globo pálido ipsilaterales a la lesión. Se observó también un decremento significativo en la liberación estimulada con alto K^+ en ambas estructuras contralaterales, estos efectos fueron observados a las 4 semanas.

Ya que en la literatura se ha descrito la existencia de conexiones interhemisféricas en los ganglios basales, así como la aparición de mecanismos compensadores en respuesta a la lesión con 6-OHDA, se discute el posible papel de estos fenómenos en este trabajo.

De este estudio se puede concluir que las células GABAérgicas estriatales se encuentran reguladas por las terminales dopaminérgicas provenientes de la substantia nigra y que existen conexiones nigro-estriatales funcionales e interhemisféricas que son sujetas a cambios plásticos como un mecanismo compensador de la denervación dopaminérgica unilateral.

Abreviaturas

CAT = Colin acetiltransferasa

EP = Núcleo entopeduncular

GABA = Acido gamma amino butirico

GAD = Descarboxilasa del Acido glutámico.

GP = Globo pálido

SN = Substantia nigra

SNC = Substantia nigra compacta

SNR = Substantia nigra reticulada

St = Cuerpo estriado

6-DHDA = 6-hidroxidopamina

K⁺ = Ión potasio

Cl⁻ = Ión cloruro

STN = Núcleo subtalámico

CCK = Colecistoquinina

PLP = Fosfato de piridoxal

GABA-T = Transaminasa del GABA

VM = Núcleo ventromedial del tálamo

Pf = Núcleo parafascicular del tálamo

INDICE

Resumen

I. Introducción General

1 Anatomía

1.1 Introducción	1
1.2 Cuerpo estriado	2
Citoarquitectura	2
Aferentes	4
Eferentes	5
1.3 Globo Pálido	6
Citoarquitectura	7
Aferentes	7
Eferentes	7
1.4 Substantia Nigra	8
Citoarquitectura	8
Aferentes	10
Eferentes	10

2. Bioquímica

2.1 Metabolismo del GABA	12
Descarboxilasa del ácido glutámico (GAD)	16
- Especificidad por el sustrato	17
- Valores de Km	17
- Compuestos con grupo tiol	18
- Agentes atrapadores de carbonilo	18
- Efecto de aminoácidos y compuestos relacionados	18
- Efecto de iones	19
- Regulación de la GAD	20
- El zinc inhibe a la GAD	22
2.2 Liberación y captación	22

3. Función del GABA en los ganglios basales	29
3.1 Enfermedades y desórdenes asociados	29
- Enfermedad de Parkinson	30
- Corea de Huntington	31
- Otros desórdenes asociados	33
3.2 Experimentos conductuales	35
- Cuerpo estriado	37
- Globo pálido	37
- Núcleos entopeduncular y subtalámico	38
- Substantia Nigra	39
- Tálamo	39
- Colículo superior y núcleo pedúnculo pontino	40
3.3 Control de la Neurotransmisión	41
II. Sección Experimental	
1. Introducción	49
2. Métodos y procedimientos	
Lesión y prueba conductual	53
Experimentos "in vitro"	55
Experimentos "in vivo"	57
3. Resultados	
Actividad de GAD	60
Liberación de GABA	61
4. Discusión y conclusiones	
Actividad de GAD	63
Liberación de GABA	68
III. Referencias	74
IV. Apendice	

I INTRODUCCION GENERAL

1 ANATOMIA

1.1 INTRODUCCION

Al hablar de la anatomía de los ganglios basales, debe ponerse atención, en especificar a qué estructuras nos referimos y cuáles han sido los criterios que se usaron para definirlos. En una primera aproximación, podemos decir que los ganglios basales son grandes masas subcorticales consideradas como derivados telencefálicos.

En general, en la anatomía clásica, se tiende a considerar dentro de la definición de ganglios basales la materia gris no cortical del telencéfalo, excluyendo al tálamo, es decir, el núcleo caudado, el núcleo lentiforme -putamen y globo pálido -, el claustrum, el complejo amigdaloides y, variando según el autor, la materia gris telencefálica ventral al núcleo caudado y al núcleo lentiforme, o sea, el fundus striati, estructuras olfatorias cercanas, substantia innominata y el séptum.

Sin embargo, otra forma para la clasificación de los ganglios basales se relaciona con la función. Parece que, siguiendo la clara relación motora que poseen estas estructuras, este enfoque es más razonable. Así, se divide a los ganglios basales en cuerpo estriado (St) - caudado y putamen - y globo pálido (GP). Bajo el mismo criterio de relación funcional y por la relevancia de las conexiones nerviosas en el sistema funcional, comúnmente se incluyen a la substantia nigra (SN),

núcleo subtalámico (STN) y al núcleo entopeduncular (EP).

1.2 CUERPO ESTRIADO

Como ya se ha mencionado el cuerpo estriado o neostriado está formado por el núcleo caudado y el putamen. En la rata estas estructuras no se pueden distinguir una de la otra. Ambas parecen tener un origen embrionario diferente, son núcleos derivados telencefálicos que provienen de diferentes partes de la cresta estriatal y siguen vías migratorias separadas, por lo cual muestran configuraciones particulares (Carpenter, 1984).

El núcleo caudado es una masa alargada gris en forma de arco relacionada en toda su estructura con el ventrículo lateral. La cabeza del núcleo se encuentra rostral al tálamo y emerge en el asta del ventrículo lateral; el cuerpo es una delgada masa celular dorsolateral al tálamo; la cola, por último, es caudal al tálamo y entra al lóbulo temporal donde termina relacionándose con el complejo amigdalino. El putamen es la parte más lateral y grande del cuerpo estriado; se localiza entre la cápsula externa y la lateral a la lámina medular del globo pálido. Se encuentra medial a la corteza insular, separadas de ésta por la cápsula externa y el claustrum; rostral y caudalmente el putamen y la cabeza del caudado forman un continuo, ya que en esa zona no se localizan fibras de la cápsula interna (Carpenter, 1981).

Citoarquitectura

Desde el punto de vista citológico el caudado y el putamen son idénticos y, aparentemente, poseen una gran homogeneidad.

Estudios de microscopía de luz y electrónica muestran dos

grandes tipos celulares, los cuales son aún subdivididos, y que son: las neuronas que poseen espinas dendríticas y las que no tienen espinas (Adinolfi & Pappas, 1968).

Las neuronas con espinas son las más numerosas del St (95%) y se subdividen en dos grupos. Las llamadas de tipo I presentan dendritas proximales, las cuales aparecen a aproximadamente 20 um del soma y se proyectan radialmente hasta una distancia aproximada de 200 um (DiFiglia et al, 1976). Se sugiere que este tipo celular emplea GABA como su neurotransmisor y que da origen a las eferentes estriatales (Jessel et al, 1978), ya que se ha localizado inmunohistoquímicamente la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en los cuerpos celulares y en las terminales nerviosas localizadas en GP y SN. Las células con espinas de tipo II tienen grandes variaciones en cuanto a su tamaño aunque tienden a ser mayores que las de tipo I y las dendritas se extienden hasta unos 600 um del soma (Adinolfi & Pappas, 1968). Aunque no se ha logrado identificar el neurotransmisor de estas neuronas, se ha sugerido que son la salida excitadora hacia la SN reticulada (SNR) y el GP (Jessel et al, 1978).

Las neuronas que no contienen espinas se subdividen en tres grupos. Las de tipo I son de tamaño, intermedio, varicosas y con dendritas recurrentes. Por inmunocitoquímica se ha sugerido que sean GABAérgicas (Ribak et al, 1979). Las de tipo II son mucho más grandes, con núcleos excéntricos y procesos dendríticos que se extienden a más de 250 um. Estas células se tiñen inmunocitoquímicamente para colin acetiltransferasa (Kimura et al, 1980), lo que sugiere su naturaleza colinérgica. Las neuronas

de tipo III se identifican por poseer núcleos localizados centralmente, dendritas de no más de 150 um de proyección y el axón corto con muchas arborizaciones; hasta la fecha no se las ha asociado con ningún neurotransmisor.

Aferentes al estriado.

a) Corteza cerebral. De la corteza cerebral proviene la mayor aferencia al estriado. En macacos, se ha comprobado que todas las regiones de la corteza, excepto la segunda región somatosensorial, envían fibras al caudado y que cada zona del caudado, recibe aferencias de más de una área cortical (Kemp & Powell,1976). Recientemente se ha demostrado, usando técnicas de doble marcaje retrógrado, que existen proyecciones interhemisféricas que surgen de las células piramidales de las capas III,IV y V de la corteza rostral (Fisher et al,1984). Se han propuesto tanto el glutamato como la acetilcolina como neurotransmisores en esta vía (Fonnum et al,1981; Nieouillon et al,1985).

b) Tálamo. Esta es, por su magnitud, la segunda proyección en orden de importancia hacia el St . Se origina principalmente en los núcleos intralaminares, específicamente en el núcleo centromediano (Graybiel,1973). Las terminaciones de estas fibras forman agrupaciones bien delimitadas, tanto en el mono como en el gato (Kalil,1978;Royce,1978). Se ha sugerido que ,en la rata, esta vía emplea acetilcolina como neurotransmisor (Neouillon et al,1985), aunque otros han propuesto al ácido glutámico (Fonnum et al,1981).

c) Del cerebro medio. De aquí surgen 2 vías y ambas emplean aminas biogénicas: serotonina y dopamina. La vía serotoninérgica

se origina en el raphe dorsal (grupo B-7 de Dahlstrom y Fuxe) y parece tener una colateral hacia la SNR (Azmitia & Segal, 1978).

La aferente dopaminérgica al estriado ha sido extensamente estudiada. Esta vía fue demostrada usando la técnica de histofluorescencia para catecolaminas por Dahlstrom y Fuxe en 1964. Posteriormente Ungerstedt (1971,a) realizó cuidadosos estudios sobre el mapeo de las fibras dopaminérgicas ascendentes y las dividió en dos componentes: i) una vía estriatal dopaminérgica que se origina en la substantia nigra compacta (SNC) - grupo A9 de Dahlstrom y Fuxe - y que se proyecta al caudado putamen y, ii) una vía dopaminérgica mesolímbica que se origina en las células mediales y dorsales a A10 y que termina en el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio. Estudios de marcaje retrógrado han demostrado que la vía nigroestriatal es bilateral y que las fibras surgen de neuronas dopaminérgicas (Consolazione et al, 1985; Pritzel et al, 1983a).

Eferentes del estriado

Aparentemente el estriado tiene pocas eferentes siendo las más importantes las fibras que surgen hacia el GP y a la SNR. Estas fibras son delgadas y poco mielinizadas y forman los lápices de Wilson que convergen radialmente sobre el GP y pasan a través de éste para así inervar al EP. Continuando su recorrido caudalmente estas fibras pasan a través del pedúnculo cerebral formando la parte ventral del peine de Edinger y, de esta forma, penetran a la SN (Brodal, 1981).

Las fibras eferentes al GP y a la SN poseen un arreglo topográfico y se originan de células con espinas de tamaño

intermedio (Carpenter, 1981). Se cree que hasta el 70% de las neuronas del St pueden proyectar a la SN (Hattori et al, 1975). Las vías del estriado al GP, EP y a la SNR son GABAérgicas (Brownstein, 1977; Fonnum et al, 1974; Hattori et al, 1975). También surgen otras eferentes hacia la SN que emplean Substancia P y dinorfina (Brownstein, 1977; Sperk & Singer, 1982; Vincent et al, 1982). La colecistoquinina (CCK) ha sido involucrada en la proyección estriado-nigral, ya que lesiones con ácido kainico en el estriado provocan un descenso en los niveles de este péptido en la substantia nigra (Emson et al, 1980).

1.3 GLOBO PALIDO

El GP forma la parte más medial y pequeña del núcleo lentiforme y se encuentra medial al putamen en toda su estructura (Carpenter, 1984). El pálido es filogenéticamente anterior al St, por lo cual, este último es conocido como neostriado y el GP como paliestriado.

El GP, al igual que el St, posee diferentes conformaciones en primates y no primates. En primates se encuentra dividido, por la lámina medular interna, en un segmento interno y uno externo. En el hombre se encuentra aún otra subdivisión, hecha por la lámina medular accesoria, en mitades lateral y medial. En roedores no es tan claro que los dos segmentos principales del GP formen una sola estructura y se reconoce que el equivalente del segmento palidal interno es el EP, el cual recibe este nombre por encontrarse embebido en el pedúnculo cerebral (Graybiel & Ragsdale, 1979).

Citoarquitectura

En el humano el segmento lateral es el de mayor volumen (70% del total) y con mayor densidad celular que el medial (Carpenter, 1984).

Estudios con tinción de Golgi han mostrado dos tipos de neuronas palidales: i) células grandes de forma ovoide o poligonal con grandes dendritas no espinales y con longitudes de hasta 900 um, este tipo celular es el predominante en el GP y ii) neuronas pequeñas con pocas dendritas (Fox et al, 1974).

Aferentes al globo pálido

La principal aferente al GP proviene del St. Se han relacionado varios neurotransmisores en la vía estriadopalidal, entre ellos al GABA, como ya se discutió previamente. La substancia P y la met-enkefalina también han sido localizadas en el GP por lo que se sugiere que provienen del St (Haber, 1981).

El GP recibe también proyecciones del STN, del núcleo acumbens y, tal vez, del Área ventral tegmental. Se cree que la proyección proveniente del STN envía colaterales a la SN y al EP y que tal vez emplee al GABA como neurotransmisor (Deniau et al, 1978).

Eferentes del globo pálido

La principal eferente del pálido es hacia el STN (Kim et al, 1976) y, en menor volumen, hacia el núcleo EP y la SN, al St y al núcleo raphe dorsal. En forma bastante difusa proyecta también a los núcleos reticular y medial dorsal del tálamo y a la corteza frontal (Nauta, 1979).

El GP interno o EP envía aferentes a los núcleos ventromedial y parafascicular del tálamo en la rata, que han sido demostradas empleando técnicas histoquímicas con peroxidasa de raíz fuerte (HRP) y autorradiografía con ³H-leucina (Carter & Fibiger, 1978). Otras vías cuya existencia se ha probado en primates con técnicas de degeneración axonal, son las dirigidas hacia la formación reticular pontina, los campos prerubrales o de Forel y, por último, hacia la habénula lateral (Nauta & Mehler, 1966).

1.4 SUBSTANTIA NIGRA

La SN es el núcleo mesencefálico de mayor tamaño, se encuentra dorsal al crus cerebri y se extiende a todo lo largo del mesencefalo. Se divide en dos partes: i) la parte compacta (SNC) que es la región rica en células y que generalmente contiene melatonina y ii) la reticulada (SNR) que posee una menor densidad neuronal (Carpenter, 1984).

Citoarquitectura

En ambas partes de la sustancia nigra, la reticulada y la compacta, se encuentran células con forma triangular o fusiforme y que, en el gato, miden de 15 a 50 μ m (Rinvik & Grofová, 1970). Se han descrito tres tipos de neuronas en la SN de la rata: i) Las neuronas grandes que se encuentran en la SNR, ii) las neuronas intermedias en la SNC y, iii) las neuronas pequeñas de axón corto que se encuentran en ambas regiones (Gulley & Wood, 1971).

En preparaciones de Golgi se observa que las neuronas nigrales tienen largas dendritas sin espinas con pocas ramificaciones. Las dendritas de la SNC tienen, principalmente, una orientación dorsoventral, mientras que las de la porción reticulada las tienen rostrocaudales (Rinvik & Grofová, 1970). Aunque es difícil demostrar la presencia de axones usando la tinción de Golgi, estructuras similares al axón dan lugar a colaterales que surgen a ángulos rectos del axón primario (Rinvik & Grofová, 1970). Las neuronas más pequeñas, de 10 a 12 μ m, que son consideradas interneuronas representan el 10% de la SNC y el 40% de la SNR.

Por estudios de histofluorescencia se ha demostrado una gran cantidad de neuronas dopaminérgicas en la SNC (Dahlstrom & Fuxe, 1964). En la SN también se ha encontrado la mayor cantidad de GAD en el sistema nervioso central (Fahn & Cote, 1968; Fonnum et al, 1974; Okada et al, 1976). La cual proviene del estriado ya que la mayor parte se encuentra en terminales sinápticas aisladas (Fonnum et al, 1974).

Estudios realizados empleando la técnica de radioinmunoensayo han demostrado la presencia de met-enkefalina en la SN (Staines et al, 1980) aunque se sugiere que no proviene de neuronas estriatales. En la SN se localiza la mayor concentración de sustancia P de todo el cerebro, encontrándose ésta acumulada en su mayor parte en terminales nerviosas que están en la SNR. Hay evidencia que sugiere que las fibras que contienen sustancia P se originan en la parte anterior del St (Gauchey et al, 1979; Gale et al, 1977). Por último, también se ha encontrado

la serotonina y su enzima de síntesis, en fibras que provienen del raphe dorsal y que hacen contacto con células dopaminérgicas (Reubi & Emson, 1978).

Aferentes a la substantia nigra

Las diferentes regiones de la SN reciben diferentes patrones de aferencia, siendo la región compacta la que más recibe. De forma breve se puede observar que la SNC recibe: aferentes del núcleo accumbens y del estriado ventral (Swanson & Cowan, 1975), de la amígdala (Bunney & Aghajanian, 1976), de la región preóptico-hipotalámica (Conrad & Pfaff, 1976) del raphe dorsal (vía serotoninérgica que se piensa es colateral de la que va al St) (Reubi & Emson, 1978), del núcleo tegmental pedunculopontino (Graybiel, 1977) y de la corteza cerebral, áreas 6 y 9 en el mono (Graybiel & Ragsdale, 1979).

La parte reticulada recibe aferentes estriatales: la aferente que contiene GABA que se origina en la parte más posterior y las fibras que contienen sustancia P que provienen de la región más anterior. También recibe la aferencia GABAérgica del GP y también se ha planteado la posible existencia de una vía subtalámico-nigral (McGeer et al, 1984).

Eferentes de la substantia nigra.

De la SNC surgen dos eferentes, la primera de ellas ya se discutió anteriormente, es decir, es la proyección dopaminérgica hacia el St y hacia la allocorteza. La otra vía se dirige al tegmento lateral del mesencefalo y a la protuberancia (Faulk & Mehler, 1978).

De la SNR se encuentran proyecciones hacia el tálamo,

núcleos ventromedial y parafascicular. Experimentos electrofisiológicos han demostrado que las proyecciones nigrotalámicas son monosinápticas e inhibitorias (Faulk & Mehler, 1978; Kitai, 1981); también se ha comprobado que el GABA es el neurotransmisor, ya que el efecto se ha bloqueado con antagonistas GABAérgicos (Starr & Kilpatrick, 1981; Yoshida et al, 1981) y porque la actividad de la GAD en el tálamo disminuye en un 33% después de la destrucción de la SN (Starr & Kilpatrick, 1981).

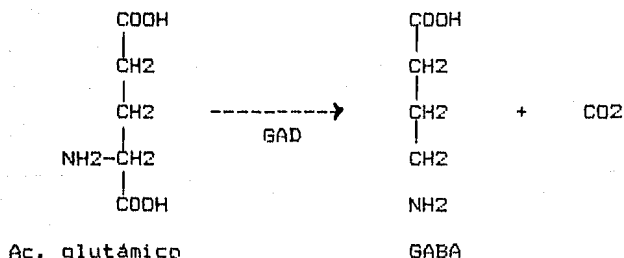
La SNR proyecta, por otra parte, hacia el colículo superior, el neurotransmisor se ha caracterizado como GABA ya que la actividad de la GAD en esta región disminuye al lesionar a la SN con ácido kainico (DiChiara et al, 1979).

En esta revisión hemos analizado las conexiones nerviosas de los ganglios basales mostrando su complejidad y la forma en que estas estructuras se relacionan entre sí. Es de gran importancia darse cuenta que por su misma interrelación no es posible afectar a alguna de estas estructuras independientemente, si no que una alteración en cualquiera de ellas se reflejará en las otras afectando a la totalidad del sistema.

El objetivo de esta revisión es el de fundamentar anatómicamente las relaciones entre las estructuras de los ganglios basales y las vías GABAérgicas, sobre las cuales, gira la idea central de este trabajo, a saber, que las vías eferentes del estriado conducen la información motora dependiente de la estimulación de los receptores dopaminérgicos estriatales.

2.1 METABOLISMO DEL GABA

Existe el acuerdo general que el ácido gama amino butírico (GABA) es sintetizado, en el sistema nervioso central, principalmente, si no exclusivamente, a partir del ácido glutámico que es descarboxilado en una reacción catalizada por la glutamato descarboxilasa (1-glutamato-1-carboxiliasa, E.C.4.1.1.15), (GAD). Esta enzima usa al fosfato de piridoxal (PLP) como co-factor (Roberts, 1960; Killan et al, 1960).

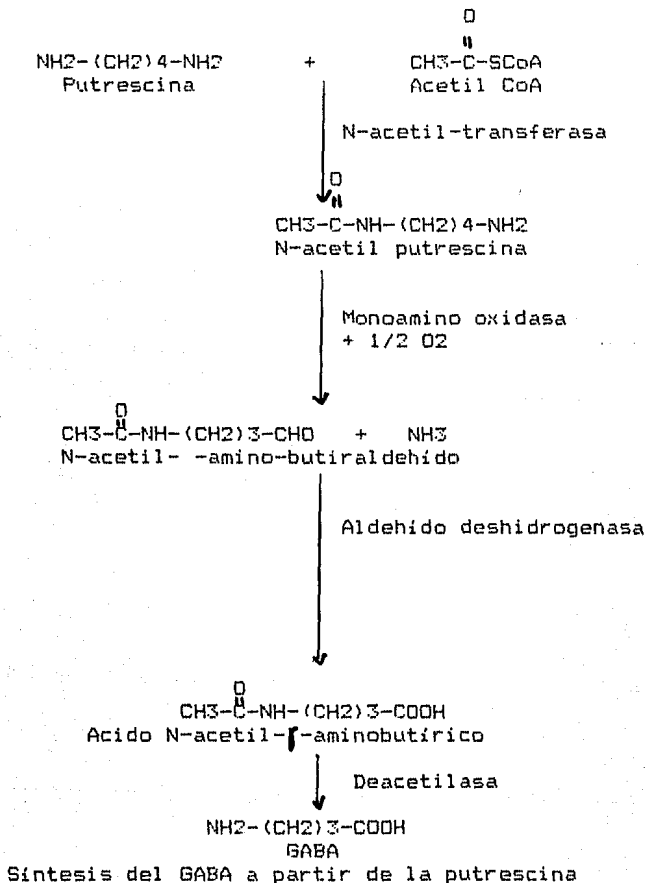


Síntesis del GABA a partir del ácido glutámico.

Se han estudiado vías alternativas para la síntesis del GABA, entre ellas, la mejor documentada es la que proviene de la putrescina, formada a partir de la descarboxilación de la ornitina (Baxter, 1976).

En cerebro de peces se ha observado que esta poliamina, la putrescina (1,4 diaminobutano) es un precursor del GABA. Sin embargo, no se ha podido comprobar si los átomos de putrescina son o no metabolizados a través de pequeños, aún no bien identificados, compartimientos de la poza de glutamato en el

cerebro de la trucha (Seiler et al,1973). En el ratón también se ha comprobado la existencia de una vía metabólica para la biosíntesis de GABA a partir de la putrescina, de cualquier forma, se ha observado que la mayor parte de la putrescina se convierte en homocarnosina (Baxter,1974; Sugahara et al,1983).



También se sabe que el GABA puede ser sintetizado a partir del α -hidroxibutirato (GHBA, OH-CH₂-CH₂-CH₂-COO⁻). Esta vía fue originalmente propuesta ya que había visto formación de GHBA a

partir de GABA, así que se hicieron investigaciones radioisotópicas marcando el GABA con (^{14}C) y separando GABA marcado, con lo que se comprobó la posibilidad de la existencia esta vía (Baxter, 1976).

Se puede afirmar que en el cerebro de mamíferos la descarboxilación del l-glutamato es la mayor y más importante vía de síntesis de GABA. De aquí se concluye que la medición de la actividad de la GAD sea una buena indicación de los niveles de GABA presente en una estructura dada (Fahn & Cote, 1968; Blinderman et al, 1978; Tappaz et al, 1976; Baxter, 1976).

Parte importante del catabolismo del GABA es un "corto circuito" metabólico. Para su destrucción, el GABA es transaminado por la GABA-oxo-glutarato-transaminasa (2-oxoglutarato-amino-transferasa; E.C.2.6.1.19). (GABA-T) para formar aldehído succínico. Esta transaminación sólo se lleva a cabo si el α -cetoglutarato (α -oxoglutarato) es el aceptor del grupo amino. De esta manera se convierte el α -cetoglutarato en glutarato, el cual es el precursor inmediato del GABA, garantizando así la continuidad en el abastecimiento del mismo. Es decir, una molécula de GABA sólo se destruye metabólicamente si, al mismo tiempo, se forma una de su precursor.

El semialdehído succínico formado partir del GABA es rápidamente transformado, por la deshidrogenasa del semialdehído succínico (NAD oxidoreductasa del semialdehído succínico, E.C.1.2.1.24), SSADH, a ácido succínico, el cual puede entrar al ciclo de Krebs (Siegel et al, 1981). Debe hacerse notar, sin embargo, que el corto circuito metabólico es, desde el punto de

vista energético, menos eficiente que la porción del ciclo del ácido tricarboxílico que va desde el cetoglutarato hasta el ácido succínico, ya que sólo proporciona 3 moléculas de ATP, contra 3 de ATP y una de GTP que proporciona el ácido tricarboxílico.

Empleando moléculas marcadas radioactivamente se ha comprobado que la glucosa es la mayor fuente "in vivo" de GABA (Gaitonde, 1965). El piruvato y varios aminoácidos son precursores de GABA al entrar al ciclo de Krebs. Así, hasta los más remotos precursores pueden ser convertidos en GABA a través de la vía del cetoglutarato a glutamato o glutamina (Gaitonde, 1965; Balasz et al, 1970; Shank & Campbell, 1983) que, en conjunto, forman más del 60% del nitrógeno de α -aminoácidos libres en el cerebro, no descartando totalmente la posibilidad de que su función sea la de un reservorio para GABA.

El "corto circuito" es el causante del gran aumento post-mortem de GABA en el cerebro. Al sobrevenir la muerte, la cantidad de cetoglutarato disminuye rápidamente, por lo que el GABA no puede ser eliminado, pero aún puede ser sintetizado a partir del glutamato, y a esto se debe el gran aumento de los niveles de GABA en los primeros minutos después de la muerte (Alderman & Schelleberg, 1974; Lindgren et al, 1982).

Descarboxilasa del ácido glutámico (GAD)

La enzima responsable de la descarboxilación del glutamato, la glutamato descarboxilasa (L-glutamato-L-carboxilasa E.C.4.1.1.15), se encuentra ampliamente distribuida en los seres vivos; filogenéticamente aparece en bacterias y hongos hasta llegar a los mamíferos más desarrollados.

La enzima cerebral es muy similar entre si en los mamíferos, pero las de peces, pájaros y anfibios son diferentes a la de ratón, que ha sido una de las más estudiadas (Wu, 1976; Sze, 1978).

Al realizar el fraccionamiento subcelular del tejido nervioso se encuentra que el 40% de la GAD se encuentra asociada a sinaptosomas, una cantidad similar se encuentra en el citoplasma y una cantidad menor en mitocondrias (Sze, 1978). Otros estudios, sin embargo, indican que la mayor cantidad de la enzima se encuentra en terminales presinápticas (Blinderman et al, 1978; Fonnum et al, 1974). Por inmunocitoquímica ha sido posible demostrar la presencia de la GAD en terminales, cuerpos celulares y dendritas en varios sistemas y especies (Wu, 1983). GABA también se ha localizado inmunocitoquímicamente en terminales, somas y dendritas en la rata (Ottersen & Storm-Mathisen, 1984).

El peso molecular de la GAD de ratón se determinó a partir de su volumen parcial específico (v), como de 85000 d y por filtración en gel se obtuvo el dato de 86000 d. Al ultracentrifugar a la GAD tratarla con guanidina $-HCl$ y β -mercaptoetanol 0.1 M se disoció en dos subunidades indistinguibles con un peso molecular aproximado de 44000 cada una. Posteriormente, estudios electroforéticos, han mostrado bandas con un peso molecular de 15000, por lo que se ha sugerido

que realmente sean 6 subunidades mínimas organizadas en 2 subunidades mayores (Wu, 1976). Existen reportes de que en la rata y el humano la GAD tiene un peso molecular de 140000 (Blinderman, 1978). Sin embargo, ya que los datos inmunquímicos señalan la similitud de las enzimas, se ha achacado esta diferencia a fuentes metodológicas (Sze, 1978).

Especificidad por el sustrato.

Mediante ensayos radioisotópicos se han probado los 20 aminoácidos que se encuentran naturalmente, al igual que el -cetoglutarato, como posibles sustratos para la GAD. De todos los que se probaron, tan solo el 1-(U-14C) $\text{COOH-CH}_2\text{-CH-COOH}$ (ácido aspártico) mostró una actividad de aproximadamente el 3% comparada con la del glutámico solo. La evidencia de que el aspártico si fue verdaderamente descarboxilado provino por la identificación del producto como alanina. También se calculó por radioactividad, la relación del CO₂ formado con respecto a la alanina encontrada y ésta fue de 1:1, es decir la misma relación estequiométrica que existe entre el glutámico y el GABA (Wu, 1976). Por tanto, la actividad de sustrato observada con el ácido aspártico marcado debe atribuirse a la descarboxilación de este ácido y no a contaminación debida al glutámico.

Valores de Km.

Los valores de Km de la GAD para el ácido glutámico, sustrato, y para el fosfato de piridoxal (PLP), su co-enzima, fueron obtenidos, para el ratón, de una gráfica de Lineawaver-Burk y fueron 0.7 mM y 0.05 uM respectivamente (Siegel, 1981; Wu, 1976).

La inhibición competitiva obtenida con reactivos con sulfhidrilo como DTNB (ácido ditiobis-(2-nitrobenzoico)) y PCMB (p-cloro mercuribenzoato) sugieren la participación de un grupo sulfhidrilo en o cerca del sitio activo. La inhibición por DTNB es independiente de la concentración de PFLP. La iodoacetamida inhibió de 35 a 85% a concentraciones de 0.16 hasta 1.6 mM; el ácido iodoacético, bajo las mismas condiciones, inhibió del 10 al 60 % (Wu, 1976).

Compuestos con grupo tiol. Se ha reportado que el ácido 3-mercaptopropiónico inhibe la actividad de la GAD en homogenados cerebrales y que provoca convulsiones al ser inyectado intraperitonealmente en la rata. A una concentración de 10mM provoca una inhibición de la actividad enzimática del 65% ; los ácidos 2-mercaptopropiónico y 2 mercaptoacético fueron menos eficaces. La inhibición producida por estos compuestos fue de tipo competitivo con respecto al glutamato, sus constantes de inhibición, K_i 's, fueron, respectivamente, de 1.8, 53 y 330 mM (Wu, 1976).

Agentes atrapadores de carbonilo. La enzima es muy sensible a la inhibición provocada por agentes atrapadores de carbonilo. De estos, el más eficaz es el ácido aminooxoacético (AOA), con una inhibición del 97% a una concentración de 0.1 mM. En orden descendente como inhibidores de la actividad enzimática siguen: hidroxilamina, hidrazina, penicilamina y semicarbazida (Wu, 1976).

Efecto de aminoácidos y compuestos relacionados. Los aminoácidos como el d-glutamato, d-l-hidroxiglutamato y d-l-metilglutamato, demostraron ser inhibidores competitivos con respecto al glutamato para la actividad de la GAD; sus K_i 's fueron de:

0.9, 2.8 y 6.2 mM. Con objeto de obtener una idea más clara de la estructura del sitio activo de la enzima se estudió la inhibición de la GAD por ácidos mono y dicarboxílicos para determinar la distancia óptima entre los dos grupos carboxílicos en la unión de los compuestos y la enzima. El ácido glutárico fue, entre los dicarboxílicos, el más eficiente ($K_i=3.5$ mM); la inhibición se reduce al aumentar o disminuir la cadena de carbonos. Los ácidos -cetoglutárico, fumárico y oxaloacético también actuaron como inhibidores competitivos (Wu, 1976).

Efecto de iones. Se comprobó que los aniones monovalentes eran inhibidores débiles, el más potente fue el SCN^- con 55 y 28% de inhibición a concentraciones de 10 y 1 mM. El orden, descendente, de eficiencia inhibidora para aniones monovalentes es el siguiente: $SCN^- > I^- > Br^- > Cl^- > F^-$. La inhibición producida por el cloruro es de interés, ya que el efecto del GABA es aumentar la permeabilidad de la membrana a éste ión. La inhibición debida al Cl^- es de carácter competitivo y tiene una K_i de 17 mM. La enzima también es inhibida por cationes divalentes, siendo su orden de eficacia el siguiente: $Zn > Cd > Hg > Cu$, los que fueron agregados como acetatos en solución amortiguadora de fosfatos (Wu, 1976).

También se han realizado estudios para determinar cuál es el pH óptimo para el funcionamiento de la enzima y se ha determinado que éste se encuentra, en el caso del ratón, cerca de 6.5. Las pruebas se realizaron usando soluciones amortiguadoras de fosfato ajustadas a diferentes valores de pH (Wu, 1976).

Se ha reportado la presencia de GABA y de actividad de la

GAD en cantidades significativas en tejidos periféricos como son: riñón, corazón, islas pancreáticas, el plexo mientérico y el oviducto. En algunos de estos órganos, la enzima parece tener propiedades bioquímicas e inmunológicas diferentes a las encontradas en el cerebro, aunque la encontrada en el oviducto es idéntica a la cerebral (Erdo, 1985). Tal vez sea posible relacionar las enzimas diferentes a la cerebral con la llamada GAD II (Haber et al, 1970) que se reportó se localizaba en riñón y gliomas humanos, pero cuya existencia fue puesta en tela de juicio al no poder reproducir los resultados (Wilson et al, 1972 ; Drummond & Philips, 1974 ; Martin & Miller, 1976).

REGULACION DE LA GAD

Desde hace bastante tiempo se sabe que un decremento en los niveles de PLP produce convulsiones (Minard, 1967) y una disminución en la actividad de la enzima, la cual regresa a niveles normales, medidos "in vitro" (Tapia, 1975). "In vivo" se observa que los síntomas neurológicos desaparecen al inyectar piridoxina (Roberts et al, 1951). Estudios tanto "in vitro" como "in vivo" han proporcionado evidencia en favor de la idea de que el fosfato de piridoxal tiene un papel fundamental en la regulación de la actividad de la GAD y en su relación con la liberación del GABA (Tapia, 1983).

Se ha concluido que existen dos tipos de actividades de la GAD en el cerebro, una de las cuales depende del PLP libre y otra que es independiente del co-factor libre. Se sabe además que la Km para el glutamato es la misma para ambos tipos de enzima. La relación en la actividad de ambas enzimas es de

aproximadamente 2.8, lo que indica que casi el 25% corresponde a la actividad independiente de PLP y el 75% a la actividad dependiente. Ambos tipos de actividad son independientes entre si y no se pueden interconvertir al cambiar las cantidades de sustrato o de co-enzima (Tapia, 1983). Se ha reportado que estas formas de la enzima difieren en la sensibilidad a la temperatura y a la movilidad electroforética, aunque la distribución total de la enzima es igual a la reportada anteriormente con el método radiométrico (Denner & Wu, 1985).

La actividad de la GAD ha sido estimada en rebanadas de St de rata y se ha visto que tanto su actividad como la cantidad de GABA sintetizado a partir de glutamato endógeno aumentan significativamente, al incubarlo en un medio depolarizante y que este incremento es función del tiempo. Se sugiere entonces que la neuronas GABAérgicas pueden aumentar la síntesis de GABA en respuesta a una depolarización neuronal (Gold & Roth, 1979).

La actividad de la GAD se encuentra regulada no solo por la unión con el sustrato o la coenzima si no por una variedad de mecanismos celulares. Así, por ejemplo, en el lóbulo óptico del embrión de pollo los niveles de la actividad de la GAD pueden ser reducidos al aumentar los niveles tisulares de GABA, ya sea al inyectarlo directamente o al aumentar los niveles de GABA debido a la inhibición de la GABA-T (Sze et al, 1971). También se ha comprobado la existencia de un sistema de retroalimentación de la GAD en animales adultos, aquí se ha observado que concentraciones fisiológicas de GABA inactivan a la GAD convirtiéndola en la apoenzima (Porter & Martin, 1984).

El zinc inhibe a la GAD. El PLP es el co-factor de la GAD y requiere de Zn^{2+} para ser sintetizada a partir del piridoxal por la fosfocinasa del piridoxal que necesita del Zn^{2+} , por lo tanto, el efecto de este metal sobre la actividad de la GAD es doble (Baxter, 1976).

La GAD cerebral puede ser inducida; se han reportado aumentos en la actividad de la GAD al aplicar glutamato (Kraus, 1968), resultado que no se ha podido reproducir (Sze, 1978). Por otra parte, la acetilcolina tiene efecto sobre la GAD en la corteza cerebelosa de ratón, aumentando su actividad durante el desarrollo (Sze, 1978).

Hasta el momento no se conoce el mecanismo de acción de la GAD, por lo que se presentará una extrapolación sobre el mecanismo de otras descarboxilasas. En varias de estas enzimas el PLP se encuentra unido débilmente a un residuo lisil. El mecanismo general, se supone, implica un ataque electrofílico del nitrógeno α -amino del aminoácido sustrato, desplazando la unión entre la enzima y el PLP formando una base de Schiff. Después de la descarboxilación y la liberación del producto se vuelve a establecer la unión entre la enzima y el PLP (Sze, 1978).

2.2 LIBERACION Y CAPTACION

La liberación de GABA ha sido demostrada "in vitro" e "in vivo". "In vitro" se han obtenido datos de liberación de GABA usando sinaptosomas en los cuales se vio que la liberación aumentaba al incrementar la concentración de K^+ y al inhibir la GABA-T (Grove et al, 1982). Se han hecho también varios estudios en rebanadas en las que se ha comprobado la liberación de GABA y en los cuales se ha visto el aumento en la liberación por

depolarización por alto K^+ y producida eléctricamente (Yamamoto et al, 1984; Okada & Hassler, 1973).

Se ha comprobado que existe una importante relación entre la liberación de GABA y la presencia de Ca^{++} . Así Cuttler et al (1971) reportaron que un medio sin calcio aumentaba la liberación espontánea de 3H-GABA en rebanadas de médula espinal de rata, observando que la ouabaina también aumentaba la liberación. En rebanadas de corteza de rata se ha reportado que la liberación de 3H-GABA aumenta al incrementar la concentración de K^+ en el medio de perfusión. El efecto del calcio se nota, en este caso, sobre la liberación inducida por potasio, ya que la ausencia de Ca^{++} en el medio inhibía el aumento en la liberación dependiente de potasio (Vargas et al, 1976). En rebanadas de SN de rata se ha reportado que la liberación espontánea de 3H-GABA recién sintetizado aumenta con concentraciones de calcio menores que la presente en el medio fisiológico; por otra parte, en el mismo trabajo se observó que, en ausencia de calcio, se inhibe el incremento en la liberación del GABA recién sintetizado causado por la estimulación con 30 mM de K^+ en el medio de perfusión (Kemel et al, 1979). El aumento en la liberación espontánea en ausencia de Ca^{++} ha sido también reportado para el glutamato y el aspartato en rebanadas de corteza cerebral (Potashmer, 1978).

En general, se ha atribuido el efecto en el aumento en la liberación basal en ausencia de calcio a un cambio en el transporte dependiente de sodio del amino ácido debido a una alteración en el gradiente sodio-potasio a nivel de la membrana neuronal (Martin & Smith, 1975). Sobre el efecto en la inhibición

en la liberación estimulada por potasio, indica que este ión es necesario en el proceso que acopla la depolarización con la liberación del neurotransmisor que se observa al llegar un potencial de acción a la terminal nerviosa.

La liberación de GABA "in vivo", se ha demostrado usando la técnica de la taza o copa cortical (cortical cup). Al estimular eléctricamente en el interior del dispositivo (1.5 mA, 1 ms, 200 Hz) o en el cuerpo geniculado lateral se encuentra un aumento en la liberación de GABA dependiente de calcio (Iversen, 1971). También se ha reportado que el aumento en la concentración de potasio (50 mM) dentro de la taza aumenta la liberación de GABA, glutamato y aspartato, mientras que si el incremento en la concentración de K⁺ es fuera de la taza aumenta la liberación de GABA pero disminuye la de glutamato (Clark & Collins, 1976). Empleando amino ácidos marcados se ha demostrado que la estimulación cortical induce la liberación de taurina y GABA (Kaczmarek & Adley, 1974).

La liberación "in vivo" de GABA ha sido estudiada utilizando técnicas en las que se perfunde el fluido cerebro-espinal. Así, se demostró la liberación de GABA endógeno en el cuarto ventrículo en respuesta a la estimulación eléctrica del cerebelo (Obata & Takeda, 1969).

La técnica de superfusión continua también ha sido empleada para estudiar la liberación "in vivo" de GABA. En un serie de experimentos (Keml et al, 1983 ; Keml et al, 1984) 4 cánulas, una en cada St y en cada SN, se implantaron en gatos anestetizados con halotano y por las cuales se midió la liberación de 3H-GABA radioactivado, de esta forma se pudo observar que

la aplicación unilateral original de agonistas (agonista al GABA), incrementa la liberación local de 3H-GABA en la zona reticulada contralateral. También se observaron cambios asimétricos en la liberación estriatal. Por otra parte, para estudiar cuales podrían ser las vías por las que pudieran cruzar las proyecciones interhemisféricas, se realizaron lesiones en el tálamo y se observó entonces que, al agregar succinil en una SN, se obtenía un incremento local en la liberación de GABA al igual que en St ipsilateral, mientras que en St contralateral se vio un aumento y en la SN del mismo lado una disminución, es decir, efectos contrarios a los del globo no lesionado. Estos resultados sugieren que existe una conexión interhemisférica en la transmisión GABAérgica en los ganglios basales y que, probablemente, se efectue a través del tálamo.

Empleando un modelo experimental similar se ha probado que la estimulación eléctrica en el St induce un aumento en la liberación de 3H-GABA en el GP ipsilateral y en el contralateral (Besson et al, 1981).

Con la diálisis intracerebral se ha estudiado la liberación "in vivo" de GABA en el St, con lo que se ha demostrado el aumento en la liberación de GABA endógeno al aumentar la concentración de K⁺ en el medio de perfusión (Tossmann & Ungerstedt, 1985), también se han realizado estudios sobre la liberación basal de GABA en ratas con lesiones hepáticas (Tossmann et al, 1983).

En principio existen ciertos mecanismos mediante los cuales el efecto de un neurotransmisor puede terminar después de haber

sido liberado de las terminales presinápticas; estos pueden ser: 1) Difusión del espacio sináptico, 2) degradación a metabolitos inactivos en el espacio extracelular y 3) transporte a elementos tisulares cercanos para la subsecuente reutilización o transformación metabólica, es decir, el fenómeno de captación.

Parece ser poco probable que los amino ácidos sean metabolizados en gran escala en el espacio extracelular (Curtis et al, 1970), por lo que el tercer mecanismo, transporte o captación, puede representar el medio más general de inactivación de un neurotransmisor (Iversen, 1971).

Así, para el caso del GABA se ha demostrado la existencia de un sistema específico de captación de gran afinidad (Okada & Hussler, 1973 ; Lanoir et al, 1982) que depende de sodio (Wheeler, 1982).

Se ha descrito que el GABA es captado por varios tipos de neuronas GABAérgicas (Hokfelt & Ljungdal, 1972) y células gliales (Iversen & Bloom, 1972) y también posiblemente por células no GABAérgicas (Belin et al, 1980). Sin embargo, la captación parece variar entre diferentes poblaciones neuronales. Por ejemplo, las neuronas estriadonigrales tienen una captación menor a la que se había estimado en función de lo visto en estudios inmunocitoquímicos a la GAD (Storm-Mathisen, 1975), mientras que en la corteza cerebral el tejido a la GAD y la captación de 3H-GABA se encuentran en acuerdo (Neale et al, 1983).

Como se acaba de mencionar la captación se ha observado en cuerpos celulares, terminales y glia. La bicuculina inhibe la captación de GABA en las tres poblaciones, por otra parte, la estricnina y la picrotoxina tienen poco efecto en la captación.

en la glia la captación fue estimulada por el ácido 2,4 diaminobutírico (Sellstrom & Hamberger, 1975).

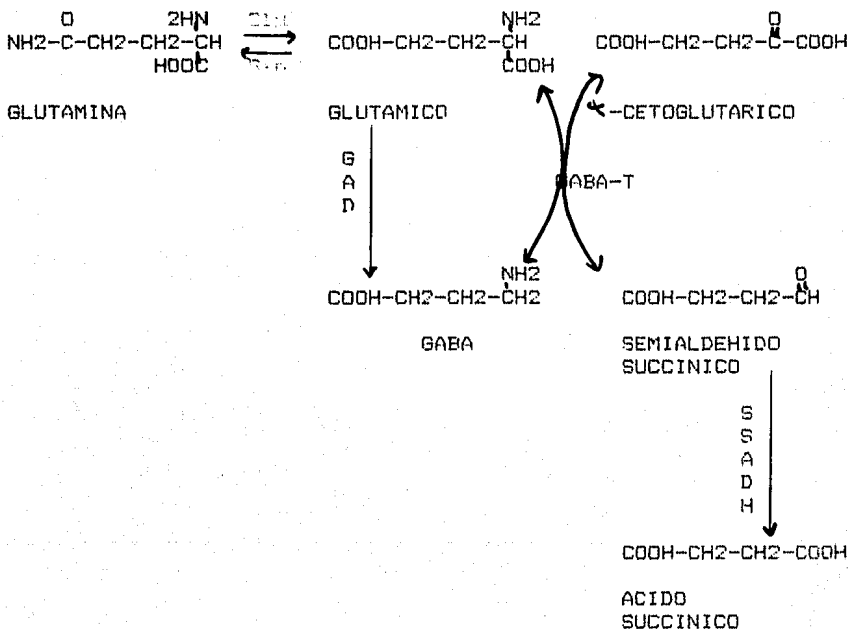
Se ha observado que aunque se aumente la cantidad total de GABA, si la actividad de la GAD es inhibida ocurren convulsiones en la rata, lo que sugiere que es el GABA recién sintetizado el que es liberado (Tapia, Sandoval & Contreras, 1975). Empleando la técnica de superfusión continua se ha demostrado que el incremento producido por K^+ en la liberación de GABA endógeno se inhibe parcialmente si se agrega ácido 3-mercaptopropiónico en el medio de superfusión (van der Hayden et al, 1980). Esto sugiere que la liberación causada por depolarización es dependiente de la actividad de la GAD, por lo que el GABA liberado por estimulación con alto potasio es el recién sintetizado.

Con la diálisis intracerebral es posible recolectar tanto el GABA liberado tónicamente como el liberado por estimulación con alto potasio, que posiblemente sea el recién sintetizado, es decir, que con esta técnica se puede medir el neurotransmisor liberado directamente relacionado con la transmisión sináptica.

A lo largo de esta segunda sección se ha revisado información concerniente a la síntesis de GABA y a su liberación.

Esta información es de gran importancia en este trabajo porque indica qué parámetros son relevantes para detectar cambios en la actividad sináptica del GABA, y la metodología más adecuada a emplear. También es relevante para la interpretación de los resultados y, en general, para ayudar a una mejor comprensión de los mecanismos básicos del funcionamiento y regulación de este neurotransmisor.

METABOLISMO DEL GABA



GAD = Glutamato descarboxilasa
 GABA-T = GABA transaminasa
 SSADH = Deshidrogenasa del semialdehido succinico
 Glu sin = Glutamino sintetasa

3 FUNCION DEL GABA EN LOS GANGLIOS BASALES

La descripción anatómica y bioquímica por sí misma, no importa cuán detallada sea, sólo ofrece una parte de la información que se requiere. Para completar la información es necesario conocer la función de cada estructura individualmente y, como es este caso, la relación de un neurotransmisor en la función del sistema.

En esta sección revisaremos algunas condiciones patológicas que proporcionaron los primeros datos de la relación que guardan los ganglios basales con la conducta motora. Posteriormente se analizarán varios experimentos conductuales que han proporcionado importantes datos tanto relacionados con la función del GABA en los ganglios basales, como sobre la función de las diversas estructuras, consideradas individualmente. También se describirán cuáles pueden ser las vías empleadas en la conducción de la información motora. Se mostrará evidencia que apoya la idea de que la información motora relacionada con la estimulación de los receptores dopaminérgicos del St es transmitida por las vías eferentes GABAérgicas hacia centros motores.

3.1 ENFERMEDADES Y DESORDENES ASOCIADOS

Las alteraciones motoras que se han observado relacionadas con danos a los ganglios basales, pueden agruparse dentro de tres grupos principales: a) Bradicinesia, es decir, dificultad para iniciar el movimiento, b) Cambio de tono y c) Movimientos

involuntarios, tales como temblores o corea.

De estas enfermedades, dos pueden relacionarse claramente con alteraciones en el metabolismo del GABA y son: la enfermedad de Parkinson y la corea de Huntington.

Enfermedad de Parkinson

La llamada enfermedad de Parkinson fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817. Sus principales síntomas son: temblor rítmico en reposo, rigidez y una gran dificultad para iniciar el movimiento (Denny-Brown, 1962). Debe, sin embargo, hacerse notar que en la enfermedad de Parkinson no se encuentran defectos en la sensación, ni problemas cognoscitivos o de memoria, sino hasta estados muy avanzados de la enfermedad, en que otras áreas se encuentran ya afectadas (Marsden, 1980). Anatómicamente, en estudios postmortem, es posible ver una marcada degeneración de la SN en las personas aquejadas de esta enfermedad. Este mal se caracteriza por un marcado descenso en los niveles de dopamina en el St, debido a la degeneración de la proyección dopaminérgica nigro-estriatal y un notable descenso (50%) en la actividad de la GAD en la SN, GP y St, estos efectos se han encontrado tanto en la rata lesionada con 6-OHDA como en pacientes humanos (Hornykiewicz et al, 1976; Kopp et al, 1983). Es por otra parte, interesante notar que pacientes tratados con L-DOPA como fármaco para la enfermedad de Parkinson, muestran un aumento en la actividad de la GAD, que es proporcional al tiempo de tratamiento durante el que se les ha administrado la droga (Hornykiewicz et al, 1976).

Habiendo eliminado el factor hereditario como causa de esta

enfermedad, no se tenía ninguna explicación de cuál podría ser su origen. Actualmente debido a una serie de circunstancias fortuitas, se ha reunido bastante evidencia que indica que la enfermedad puede ser causada por el MPTP (1,metil-4,fenil-1,2,5,6,tetrahidropiridina) que se ha demostrado, es una toxina específica para las neuronas dopaminérgicas de la SNC y, la cual, se ha empleado como un modelo animal mucho más adecuado que el de la 6-OHDA (6-hidroxi-dopamina) ya que , aparentemente, no afecta a ninguna otra catecolamina y se puede aplicar de una manera sistémica, evitando así la lesión estereotóxica. Se han reportado casos de pacientes que han tomado una dosis considerable de ésta droga y que han desarrollado síntomas muy parecidos a los de la enfermedad de Parkinson pero en periodos muy cortos. Por otra parte estudios epidemiológicos han relacionado una alta incidencia de la enfermedad en regiones industrializadas en las que se piensa el MPTP podría ser un contaminante atmosférico, es por eso, que la toxina se está empleando actualmente como un modelo experimental en animales pero también se piensa que pueda relacionarse con el origen de la enfermedad (Langston et al, 1983 ; Lewin, 1984).

Corea de Huntington

En 1872 George Huntington dio a conocer las observaciones que él, su padre y su abuelo habían hecho en ciertas familias que vivían en un pueblo en el estado de Nueva York. Este grupo de personas tenía una enfermedad caracterizada por tres síntomas principales: ser hereditario, la presencia de movimientos espasmódicos involuntarios y la aparición de demencia (Hayden,1983).

Los estudios realizados en sujetos con esta enfermedad

muestran una gran degeneración y pérdida neuronal en el St, en el cual, las células más pequeñas, caracterizadas como interneuronas GABAérgicas y colinérgicas son las más afectadas. Se localizan pérdidas celulares en la SN y, en los casos más graves, se ha reportado pérdida celular en el lóbulo temporal, STN y núcleo centromediano del tálamo (Spokes,1981).

En 1973 se reportó que había una reducción significativa en los niveles de GABA en el núcleo caudado, putamen, GP, SN y corteza occipital de personas con esta enfermedad (Perry et al,1973). Desde entonces se ha podido probar que los niveles de GAD disminuyen, al igual que los de la colin acetiltransferasa (CAT), en el St de pacientes (Spokes,1981). Se han realizado estudios sobre la cantidad de receptores a GABA y a acetilcolina, que indican claras disminuciones con respecto a los controles (Enna,1974). Los datos aportados por diversos grupos de investigadores sobre el descenso de la GAD en el St, hablan de bajas de 65 hasta el 85% y del 56% para la CAT. Asimismo se reporta una disminución del 69% de la actividad de la GAD en la SN en humanos (Spokes,1981;Enna,1974). Se estima que la reducción de la actividad de la GAD en el GP puede deberse tanto a la degeneración de las células GABAérgicas ahí presentes como a la destrucción de las neuronas GABAérgicas que proyectan desde el St.

Para esta enfermedad se ha desarrollado un modelo animal consistente en la inyección intraestriatal de ácido kaínico. Se ha reportado que esta toxina solamente destruye los cuerpos celulares y no las fibras de paso, por lo que produce efectos

anatómicos, histológicos y bioquímicos, similares a los observados en tejido postmortem de pacientes con esta enfermedad (Coyle & Schwarcz, 1976).

Otros desórdenes asociados con los ganglios basales.

Otras enfermedades también relacionadas con los ganglios basales son las que, brevemente, se discuten a continuación.

La corea de Sindenham se conoce también como corea menor o corea infecciosa. Se presenta a edad temprana, frecuentemente después de padecer fiebre reumática. Los desórdenes del movimiento son similares a los observados en la corea de Huntington. No se han realizado muchos estudios postmortem, por lo cual aún no es clara su fisiopatología (Brodal, 1981).

Los síntomas clínicos involucrados en la atetosis doble afectan especialmente las manos, la boca y el cuello; los pacientes también muestran rigidez. En cuanto a su fisiopatología se ha observado en estudios postmortem, que el segmento externo del putamen presenta un tono jaspeado en ambos lados; como causa de este trastorno se menciona la anoxia durante el nacimiento (Denny-Brown, 1962).

La discinesia tardía, es un desorden motor que se manifiesta por movimientos involuntarios, especialmente se ven afectados los grupos musculares facio-lingüo-bucales. Es un desorden inducido médicamente, ya que es causado por un tratamiento prolongado con drogas antipsicóticas, las cuales bloquean la transmisión dopaminérgica (Carlsson & Linnquist, 1963). Sin embargo también se ha reportado que esta enfermedad se presenta en sujetos de edad avanzada, los cuales nunca recibieron tratamiento antipsicótico (Blowers, 1983).

El síndrome de Hallervorden-Spatz, es un desorden frecuente que afecta principalmente a niños y adolescentes, se caracteriza por una progresiva rigidez de las extremidades, precedida por movimientos coreicos, atetosis y mioclonus. Se presentan también ataques epilépticos y deterioro mental. Se ha observado una pérdida de células, gliosis y pigmentación anormal del GP y de la SNR, así como también depósitos anormales de hierro en esta estructura (Denny-Brown, 1962; Seab, 1983).

La enfermedad de Wilson es conocida también como degeneración hepato-lenticular, la etiología de esta enfermedad es un error congénito en el metabolismo, que se traduce en una acumulación de cobre, unido a proteínas, en diferentes órganos, principalmente en el hígado y en los ganglios basales, siendo el putamen la estructura más afectada. Esta enfermedad se caracteriza por una progresiva rigidez, temblor, cirrosis hepática y hepatitis recurrente (Denny-Brown, 1962).

La etiología del hemibalismo consiste una lesión vascular unilateral del núcleo subtalámico. Se caracteriza por movimientos involuntarios y violentos de la pierna y brazo contralaterales a la lesión, así como también del tronco y el cuello. A veces los movimientos anormales son restringidos a un brazo o a una pierna (monobalismo), siendo frecuentemente el brazo la parte más afectada. Se presenta hipotonía y pérdida de la fuerza muscular (Denny-Brown, 1962; Bradley, 1984).

El estudio de enfermedades relacionadas con los ganglios basales, tanto de sus síntomas como de lo que no es afectado por

la enfermedad, ha sido de gran utilidad para presentar un modelo de la función de este sistema.

Se podría considerar simplificando el sistema, que los ganglios basales tienen dos áreas: una de las cuales sería receptora, el St, la cual enviaría instrucciones a posibles áreas motoras ejecutivas, es decir al GP y a la SN. El St recibiría así información aferente de la corteza y de los núcleos talámicos sensoriales, la cual organizaría somáticamente y a partir de la cual elaboraría un plan que indicaría no solamente cómo actuar, sino dónde y cuándo. Esa información sería entonces transferida al GP y a la SN que se encargarían del cómo actuar, es decir, de escoger qué músculos activar, cuáles suprimir, por cuánto tiempo y en qué secuencia (Marsden, 1980).

3.2 EXPERIMENTOS CONDUCTUALES

Al parecer se han desarrollado un importante número de evidencias experimentales que indican que el GABA es el mediador de conductas motoras dependientes de la estimulación de los receptores dopaminérgicos en el St.

Gracias a estudios anatómicos de las conexiones del St, se ha proporcionado evidencia de que esta estructura está localizada en una posición clave como una unidad integradora en el sistema de los ganglios basales. El St podría entonces ser capaz de influenciar y modular funciones de la corteza, el cerebelo y el tálamo (Brodal, 1981). Como ya se ha discutido, recibe una inervación masiva de la corteza, y también se sabe que el cerebelo y el St tienen importantes proyecciones al tálamo, el

cual puede influenciar la elaboración cortical de la actividad motora. La evidencia conductual también indica que el GABA es de gran importancia en la expresión conductual relacionada con la estimulación de los receptores dopaminérgicos (Scheel-Kruger, 1982).

Un modelo que ha sido de gran utilidad en estos estudios es el desarrollado por Ungerstedt en 1971, en este trabajo se destruyeron las células dopaminérgicas de la SN, unilateralmente, por medio de la inyección estereotáxica de la neurotoxina selectiva a neuronas dopaminérgicas 6-OH dopamina (6-OHDA); posteriormente se inyectó apomorfina (agonista dopaminérgico) sistémicamente y se observó una conducta de giro contralateral al sitio de la lesión, que se atribuyó a la hipersensibilización de los receptores dopaminérgicos en el St (Ungerstedt, 1971 b y c). La hipersensibilidad es debida a un incremento en la cantidad de los receptores, así como por un aumento en su afinidad por el ligando, que es causada por la disminución en la cantidad de dopamina disponible (Feurstein, 1981). Esta es una importante evidencia de la existencia de conductas motoras dependientes de dopamina en el St, ya que el giro contralateral habla de una mayor actividad neuronal en el lado supersensibilizado. Un experimento interesante que comprueba el hecho de la mayor actividad de la dopamina en el lado opuesto al giro, consiste en entrenar ratas a girar en un solo sentido. Durante la expresión conductual se midió la liberación "in vivo" de dopamina, viéndose que era significativamente más alta en el lado contrario al giro (Yamamoto et al, 1982). Este experimento resulta interesante ya que no se lleva a cabo ninguna lesión ni tratamiento

farmacológico, por lo que la preparación es sujeta a menos manipulaciones y, por tanto, a una situación más real.

Los experimentos conductuales que involucren la lesión o la estimulación de una sola estructura, han sido una importante herramienta para dilucidar qué estructuras participan en la expresión conductual por estimulación del receptor dopaminérgico. Por lo tanto, se examinará la evidencia experimental que han aportado:

Estriado

Se sabe que la inyección intracaudal de drogas dopaminérgicas o la estimulación eléctrica de la vía estriado-nigral, producen giros en dirección opuesta al lado de mayor actividad dopaminérgica (Ungerstedt et al, 1969; Arbuthnott & Crow, 1971). También se ha visto que la destrucción de la vía estriado-nigral, en animales previamente lesionados con 6-OHDA, inhibe la conducta de giro inducida por apomorfina (Marshall & Ungerstedt, 1977; García-Muñoz et al, 1977).

Globo Pálido

Se han realizado experimentos farmacológicos en el GP que han mostrado su relación con la conducta motora. La inyección de muscimol (agonista GABAérgico) en este núcleo produce catalepsia que dura hasta dos horas, pero que es revertible por la aplicación de antagonistas al GABA, como la picrotoxina. Este efecto es bifásico y dependiente de la dosis, ya que a dosis mayores de 50 ng de muscimol, en la parte ventral del GP, se produce una catalepsia corta, de 5 a 10 min, que es seguida por

un período en el que la rata muestra una alternancia de estados catalépticos y de excitación. (Schell-Krüger et al, 1981b). La inyección unilateral de muscimol también tiene efectos bifásicos ya que se alternan la asimetría postural ipsilateral con la contralateral (Schell-Krüger et al, 1981a). La aplicación de muscimol en el St, en la región cercana al GP, también tiene un efecto cataleptogénico (Scheel-Krüger et al, 1981b).

Núcleos Entopeduncular y Subtalámico

Otra importante vía de salida de los ganglios basales es la que se origina en el EP; al mismo tiempo, la vía St-EP se encuentra muy relacionada anatómicamente con la vía estriado-nigral además de que ambas contienen GABA. Así, en el EP, la inyección bilateral de muscimol, induce una conducta casi igual a la producida por la inyección sistémica de agonistas dopaminérgicos, e inhibe la catalepsia provocada por el haloperidol (antagonista al receptor dopaminérgico). Por otra parte, la inyección de picrotoxina en EP produce sedación y catalepsia (Scheel-Krüger, 1981b).

La inyección de muscimol en el STN tuvo efectos similares a los descritos para EP, lo que sugiere que los agonistas dopaminérgicos actúan bajo el mismo mecanismo que la inyección local de muscimol. Se podría sugerir entonces que en este caso también se activan los sistemas descendentes de salida del St que son mediados por GABA, como el St-EP; St-GP; GP. Más aún, el giro contralateral inducido por apomorfina en sujetos lesionados con 6-OHDA se convierte en ipsilateral si se inyecta picrotoxina en el EP o en el STN ipsilateral a la lesión (Scheel-Krüger et al,

1981b).

Substantia Nigra

La aplicación bilateral intranigral de bloqueadores GABAérgicos, como picrotoxina y bicuculina, producen un estado catatónico que no se puede revertir por la aplicación de agonistas a la dopamina (DiChiara et al, 1978). Se ha comprobado que la inyección unilateral de bloqueadores a GABA, en la SN, antagoniza la conducta de giro producida por apomorfina cuando esta inyección ha sido ipsilateral a una lesión previa con 6-OHDA (DiChiara et al, 1978).

Se sabe que la inyección bilateral de agonistas GABAérgicos en la SN produce conducta estereotipada. También a la administración unilateral de agonistas GABAérgicos induce giro contralateral (Scheel-Kruger et al, 1981a; Arnt & Scheel-Kruger, 1979). Estos efectos son producidos independientemente de la dopamina, apoyando la hipótesis de que en esta cadena de estructuras, el GABA es un paso más allá de los receptores dopaminérgicos.

Se ve, por lo tanto, que la función de los receptores dopaminérgicos en el St podría ser la de activar la vía descendente estriado-nigral. Para apoyar esta hipótesis se ha comprobado que la apomorfina aumenta la utilización de GABA en la SN y que los antagonistas dopaminérgicos la disminuyen (Pérez de la Mora & Fuxe, 1977; Scheel-Krüger, 1981b).

Tálamo

Para ver de qué forma se relacionan las salidas GABAérgicas de la SN con la conducta motora, se han hecho experimentos

conductuales en el tálamo y en el colículo superior.

La inyección unilateral intratálámica, de picrotoxina en los núcleos ventromedial (VM) y parafascicular (Pf), produce amplios giros contralaterales (Kilpatrick et al, 1981; Zainos et al, 1984). La inyección de muscimol induce giros cortos en sentido ipsilateral a la inyección, esto es, en el sentido opuesto a los giros inducidos por la aplicación intranigral de muscimol (Kilpatrick et al, 1981). La inyección bilateral de muscimol produce catatonía en la rata (Zainos et al, 1984). Por último, la destrucción ya sea por ácido kainico o por electrocoagulación del VM, o bien la aplicación intratálámica de muscimol elimina la conducta de giro producida por la aplicación intranigral de muscimol (Kilpatrick et al, 1981). La conducta de giro provocada por apomorfina después de una lesión de 6-OHDA es inhibida por la lesión ipsilateral de VM (García-Muñoz et al, 1983). También se ha visto que la estimulación con apomorfina en el St provoca un aumento en el disparo de las células del VM y que este efecto sólo se puede evitar lesionando la SN, pero no el GP o el EP (Patiño & García-Muñoz, 1985).

Estos resultados indican en general que el tálamo se relaciona con las conductas motoras dependientes de la estimulación dopaminérgica estriatal, y que el mecanismo de acción es GABAérgico, ya que se puede manipular farmacológicamente con agonistas y antagonistas GABAérgicos. Además señalan que la SN es un relevo en esta cadena.

Colículo Superior y Núcleo Pedúnculo Pontino.

Se ha visto que la destrucción de las capas superiores del

colículo superior en animales previamente lesionados con 6-OHDA en el mismo lado, no inhibe la conducta de giro producida por apomorfina (García-Muñoz et al, 1982). Pero si la lesión se realiza en las capas inferiores del colículo superior, se puede inducir giro por estimulación de receptores a dopamina (DiChiara et al, 1979)

Las lesiones del núcleo pedúnculo pontino aunque inducen una leve asimetría y giro por estimulación con apomorfina, no inhiben la conducta de giro inducida por lesión con 6-OHDA (García-Muñoz, et al, 1982).

Si se unen la información anatómica y electrofisiológica que demuestra la existencia de la proyección GABAérgica nigro-talámica con los experimentos conductuales, se puede concluir que la vía nigro-talámica se relaciona con la mediación GABAérgica de las conductas motoras dependientes de dopamina, más que las proyecciones descendentes de la SN.

3.3 CONTROL DE LA NEUROTRANSMISION

Si bien la dopamina es el neurotransmisor responsable de la activación de una posible cadena de estructuras, es importante saber cómo ejerce su efecto en el St. Se ha considerado que las proyecciones nigro-estriatales hacen sinapsis con interneuronas colinérgicas del St y que éstas son un relevo hacia las células de salida. Esta hipótesis se apoya en bases histológicas (Hattori et al, 1976) y también en el hecho de que las drogas anticolinérgicas reducen el efecto de los neurolépticos en la utilización de dopamina (Bartholini, 1980). Además, la

utilización de la acetilcolina es sensible a estas drogas (Bartholini, 1980). Se conoce también evidencia anatómica que indica que sobre neuronas identificadas inmunocitoquímicamente como colinérgicas, se encuentran terminales nerviosas en degeneración, dos días después de la inyección intraventricular de 6-OHDA (Hattori, et al, 1976). Los trabajos que sugieren una conexión entre células que contienen dopamina y las de acetilcolina han sido puestos en duda recientemente. En el trabajo de Freund et al, (1984) se indica que el antisuero usado por Hattori et al, (1976) no es específico para la colina-acetiltransferasa, por lo que consideran que la conclusión obtenida por este grupo no es válida. Por otra parte, basándose en el efecto sobre la actividad de la GAD y la acumulación de GABA también se maneja la idea de que este relevo sea llevado a cabo por interneuronas GABAérgicas en el St (Gale & Casu, 1981). Recientemente también se ha presentado evidencia anatómica, que indica que las neuronas dopaminérgicas de la SN hacen sinapsis directamente sobre las espinas dendríticas de las células espinosas; estas células son de tamaño medio y proyectan a la SN (Freund et al, 1984). Este tipo neuronal ha sido identificado, como se vio en la Sección 1.2 como GABAérgico (Jessel et al, 1978). La denervación unilateral de las aferentes dopaminérgicas al St, ya sea por lesiones con 6-OHDA o por el corte de las fibras nigro-estriatales, produce un aumento en la actividad de la GAD en el St luego de un periodo de 4 semanas en la rata (Gale & Casu, 1981; Vincent et al, 1978). En ratas así denervadas, si se les inyecta gama-vinil-GABA (GVG), un inhibidor

de la GABA-T, se nota una gran acumulación de GABA en el estriado (Gale & Casu, 1981).

Ambos experimentos indican que la falta de transmisión dopaminérgica en el St induce un aumento de GABA en el mismo. De aquí se puede concluir que la inervación dopaminérgica en el St ejerce una acción inhibitoria sobre células estriatales que contienen GABA.

La relación que existe entre los diversos neurotransmisores en el St es bastante compleja. Uno de los principales puntos a investigar ha consistido en saber si la liberación de dopamina es controlada por un mecanismo de retroalimentación nigro-estriado-nigral o si es controlado por autorreceptores. Otro punto de interés ha sido la relación entre diversos neurotransmisores en el St. En 1963 se sugirió que el efecto de los neurolepticos en el metabolismo de la dopamina era la producción de un aumento en la utilización de la dopamina debida al bloqueo de sus receptores (Carlsson & Lindquist, 1963). Como en esa época ya se aceptaba la existencia de las conexiones nigro-estriado-nigrales, se impuso la teoría de que existía un mecanismo de retroalimentación negativa cerrada, en el cual la acción de la dopamina en los receptores del St activaría la salida de GABA del St a la SN la cual a su vez, regularía el metabolismo de la dopamina. Este modelo tenía información que le favorecía; entre ésta, se encuentra el hecho de que la inyección de GABA en la SN disminuye la utilización de dopamina y que la aplicación iontoforética de GABA sobre las neuronas dopaminérgicas en la SN inhibe su disparo (Aghajanian & Bunney, 1973). Sin embargo, se ha encontrado que la destrucción de las fibras estriado-nigrales no afecta la

utilización de dopamina en el estriado, ni el incremento en la utilización después de la aplicación de haloperidol (García-Muñoz et al, 1977; Tulloch et al, 1979).

Estudios recientes con la técnica de microdialisis intracerebral han confirmado el control presináptico de la liberación de dopamina observado en estudios "in vitro" (Zetterstrom & Ungerstedt, 1984 ; Zetterstrom et al, 1985).

Se había observado en rebanadas que la aplicación de dosis bajas de apomorfina disminuyen la liberación de dopamina exógena en el estriado hasta en un 50% (Farnebo & Hamberg, 1971). Ahora, se ha visto "in vivo" que la dosis de apomorfina debe aumentarse 10 veces para eliminar completamente la liberación (Zetterstrom & Ungerstedt, 1984). Por otra parte se ha visto que la administración subcutánea de sulpiride, haloperidol y cis-flupentixol en ratas disminuye la liberación estriatal de dopamina endógena (Zetterstrom et al, 1985). Estos trabajos indican que la liberación de dopamina en el St se encuentra controlada, aunque no totalmente, por autoreceptores que se encuentran en las terminales de las aferentes nigrales. Por otra parte parece que la sustancia-P podría estar relacionada con esta regulación, ya que se ha observado, que si se inyectan antagonistas al péptido en la SN, se puede evitar la activación de la tirosina hidroxilasa causada por la inyección sistémica de haloperidol lo que sugiere que la sustancia-P nigral puede tener un papel importante en la activación de las neuronas dopaminérgicas que proyectan al St (Melis & Gale, 1984).

Se ha reportado que agonistas muscarínicos y nicotínicos

aumentan la liberación de dopamina en rebanadas de St de rata (Giorguieff et al, 1977) y que es necesaria la presencia de antagonistas colinérgicos de ambos tipos para eliminar completamente el efecto producido por la acetilcolina (Giorguieff-Chesselet et al, 1979a), lo que sugiere que ambos receptores colinérgicos se encuentran relacionados con la liberación de dopamina, pero que este efecto no involucra actividad nerviosa, ya que no es bloqueado por tetrodotoxina (TTX) (Giorguieff et al, 1977a). Esto sugiere que la acetilcolina actúa directamente sobre las terminales dopaminérgicas. Sin embargo, se ha visto que el número de sitios de unión a (3H) atropina disminuye a los 7 y 14 días posteriores a una lesión con 6-OHDA, pero que a los 20 días vuelve a sus valores control (Kato et al, 1978). Esto indica un fenómeno compensador en el St, pero también sugiere que los receptores colinérgicos no se encuentran en las terminales dopaminérgicas.

Por otra parte, se ha visto, que la apomorfina aumenta la utilización de la acetilcolina en una forma dependiente de la dosis (Langnickel et al, 1983), lo que indica una relación entre la aferencia dopaminérgica y las interneuronas colinérgicas.

"In vitro", ha sido posible probar que los opiáceos aumentan la liberación de (3H) dopamina y se cree que este efecto esté mediado por una acción sobre los receptores delta (Lubetzky et al, 1982). En general la idea que se tiene es que los opiáceos endógenos y, tal vez, la encefalina estriatal, puedan regular la transmisión dopaminérgica en el St actuando sobre receptores que se encuentran en las terminales dopaminérgicas.

Después de la degeneración unilateral de las neuronas

dopaminérgicas nigro-estriatales producida por la 6-OHDA se observó un descenso en los sitios de unión α -adrenérgicos, lo que sugiere que se encuentran en las terminales nerviosas estriado-nigrales (Reisine et al, 1979). Posteriormente se comprobó que la aplicación de isoproterenol incrementaba la liberación de (3H)DA y que esto es independiente del bloqueo con TTX, lo que sugiere que la noradrenalina modula presinápticamente la liberación de dopamina (Reisine et al, 1982).

Sobre el efecto de los aminoácidos se ha comprobado que el glutamato aumenta la liberación de dopamina exógena en rebanadas de St de rata (Giorguieff et al, 1977b), también "in vivo", ya que se encuentra un aumento en la liberación de 3H-dopamina usando la cánula de superfusión continua al estimular eléctricamente en la corteza (Nieouillon et al, 1978). La glicina y el GABA también aumentan la liberación de dopamina recién sintetizada en rebanadas de St de rata (Giorguieff et al, 1978; Giorguieff-Chesselet et al, 1979b). Otro grupo reporta que, en rebanadas de St de rata, el GABA a altas concentraciones aumenta la liberación de dopamina exógena y que disminuye la liberación de acetilcolina recién sintetizada. Se sugiere que el efecto del GABA decrece de la parte frontal a la caudal, es decir, de acuerdo con la distribución estriatal del GABA. Estos autores proponen que, de hecho, el efecto del GABA sobre la dopamina es indirecto y que la causa real es la disminución en la liberación de la acetilcolina producida por el GABA, que elimina la inhibición que este neurotransmisor tiene sobre la dopamina (Stoof et al, 1979).

Usando la diálisis intracerebral se ha visto que el pergolide, antagonista dopaminérgico, provoca un importante decremento en la liberación de GABA en el St, mientras que la apomorfinina no tiene efecto. Este experimento sugiere que los receptores dopaminérgicos se encuentran funcionalmente unidos a las neuronas GABAérgicas (Tosman & Ungerstedt, 1985).

En esta sección hemos visto cuán complejas son las relaciones entre los diferentes neurotransmisores en el St y que la información es, ocasionalmente, contradictoria. Sin embargo, se ha visto que varias sustancias tienen efecto sobre la liberación de dopamina. Se sugiere que el control de la actividad sináptica de la dopamina, se ejerce primordialmente a nivel presináptico sobre receptores y autoreceptores localizados en las terminales nerviosas de las eferentes nigro-estriatales. De la relación dopamina-GABA, a partir de los datos que se han analizado se desprende que funciona en ambos sentidos. Así, la pérdida de la inervación dopaminérgica en el St produce un aumento en la actividad de la GAD (Vincent et al, 1978; Gale & Casu, 1981) y un aumento en la acumulación de GABA (Gale & Casu, 1981), lo que sugiere un control inhibitorio de la dopamina sobre las células GABAérgicas. Por otra parte, el GABA también ejerce control excitador sobre la liberación de la dopamina (Giorgiueff, 1978; Stoof et al, 1979), lo que indica la existencia de un sistema de retroalimentación local.

Con estos datos se puede proponer que el control de la liberación de la dopamina en el St es un fenómeno local regulado presinápticamente. De acuerdo a los estudios conductuales revisados aquí, se puede proponer que la salida estriado-nigral

tiene una función de salida motora, en la cual la misma SN es un relevo hacia estructuras que no pertenecen al sistema de los ganglios basales.

En este trabajo se estudió la posible cadena GABAérgica que serviría de salida a la información dopaminérgica proveniente de la SN y cual puede ser el efecto que tiene la dopamina en la regulación de la células GABAérgicas estriatales. Tomando en cuenta los aparentes cambios plásticos que suceden como consecuencia de la lesión con 6-OHDA en este estudio, a diferencia de anteriores (Vincent et al, 1978 : Gale and Casu, 1981) se decidió medir la actividad de la GAD a diferentes tiempos y en varias estructuras diferentes. Los estudios "in vivo" nos permitieron estudiar el efecto de la degeneración dopaminérgica sobre la liberación de GABA y observar los efectos bilaterales de la lesión, empleando una técnica nueva en un modelo en el que no se habían realizado experimentos de liberación.

II SECCION EXPERIMENTAL

1. INTRODUCCION.

Existe evidencia anatómica que muestra la existencia de una vía dopaminérgica nigro-estriatal (Ungerstedt, 1971a). Se propone también que las eferentes GABAérgicas del St se relacionan con la conducción de la información motora dependiente de la estimulación de los receptores a dopamina (Scheel-Kruger, 1982).

Existen síndromes clínicos en los que se han detectado alteraciones en las concentraciones de dopamina, de GABA y en la actividad de la GAD en los ganglios basales (Ferry, 1973; Hornkiewicz, 1976).

Morfológicamente se ha demostrado la relación que existe entre las terminales dopaminérgicas estriatales y las células que proyectan hacia la SN (Freund et al, 1984). Es también bien conocido que la actividad de la GAD en el St es afectada por la carencia de aferentes dopaminérgicas nigrales (Vincent et al, 1978; Gale & Casu, 1981) y, que como se ha visto en estudios de liberación, existe una interacción entre el GABA y la dopamina (Stoof et al, 1979; Giorguieff et al, 1978).

Los resultados que se señalaron en la Introducción, hacen pensar, que sería interesante ahondar más en el estudio de la relación dopamina-GABA, no sólo en el St, si no en otras estructuras anatómicas relacionadas con la proyección GABAérgica en los ganglios basales que son: el GP, el EP y la SN, con objeto de estudiar la cadena GABAérgica que se ha propuesto, conduce la

información motora dependiente de la estimulación de los receptores dopaminérgicos en el St.

Con tal objeto se realizaron dos tipos de experimentos, diseñados para estudiar los cambios en la actividad de las neuronas GABAérgicas en St, GP, EP y SN después de la denervación dopaminérgica del estriado, en uno se cuantificó la actividad de la GAD y en otro se midió la liberación "in vivo" de GABA.

La denervación dopaminérgica se logró mediante la inyección estereotáxica, en el haz del cerebro medio anterior, de la neurotoxina específica para células catecolaminérgicas, la 6-OHDA. El éxito de la denervación se juzgó en función de la conducta de giro inducida por apomorfina (Ungerstedt, 1971a y b; Mitchell & Redgrave, 1980; Ungerstedt & Herrera-Marschitz, 1981).

La actividad de la GAD se considera un buen marcador de células GABAérgicas (Fahn & Cote, 1968; Tappaz et al, 1976), existen además, datos que indican que la actividad de esta enzima varía con la actividad eléctrica de las células (Gold & Roth, 1979). Se conocen también datos acerca de los cambios en la actividad de la enzima ya sea por destrucción de las aferentes a las células GABAérgicas (Vincent et al, 1978; Gale & Casu, 1981; Nicoullon & Dusticier, 1981), o tratamientos farmacológicos (Itoh et al, 1976; Gunne et al, 1984). Así pues, se pensó que la actividad de la enzima podría reflejar cambios en la actividad sináptica de las neuronas GABAérgicas por lo que se decidió medir la actividad de la enzima en St, GP, EP y SN. Como otros investigadores han reportado cambios en función del tiempo tanto en la actividad eléctrica de las células denervadas (Schultz & Ungerstedt, 1978) como en las proyecciones cruzadas (Pritzel et al, 1983b), se

consideró también de interés ver si la actividad enzimática se alteraba en función del tiempo después de la lesión con 6-OHDA. Por este motivo se midió la actividad de la GAD 4 y 8 semanas después de la lesión.

Se han hecho estudios de liberación de GABA "in vitro" (Stoof et al, 1979 ; Kemel et al, 1979) e "in vivo" usando tanto la cánula de perfusión continua (Besson et al, 1981; Besson et al, 1982), así como la diálisis intracerebral (Tossmán et al, 1983; Tossmán & Ungerstedt, 1985). Los resultados de liberación "in vivo" se asemejan más a condiciones fisiológicas y, por lo tanto, la información que proveen puede ser extrapolada más directamente a la función. Además, se pueden sortear varios de los problemas inherentes a la medición de la actividad enzimática, prueba que se realiza "in vitro", y en condiciones saturantes del co-factor. Es decir, en el ensayo enzimático no se puede distinguir si el cambio en la actividad de la enzima se debe a la disponibilidad del co-factor, a cambios en las propiedades de la enzima o bien a un cambio en la síntesis de la enzima. Además, estos cambios no se pueden relacionar directamente con la liberación del neurotransmisor, especialmente del recién sintetizado que es de mayor importancia para la función sináptica.

Por estas razones se decidió hacer otro grupo de experimentos en los que se midió la liberación de GABA endógeno "in vivo" en el St y GP en ambos hemisferios, 4 semanas después de la denervación dopaminérgica estriatal. Para los estudios de liberación "in vivo" se utilizó la técnica de la diálisis

intracerebral. El principio básico de este método es que las moléculas endógenas que se encuentran en el espacio extracelular cerebral difunden, debido al gradiente de concentración, a través de una membrana semipermeable hacia el medio de perfusión. Por otra parte, aplicando el mismo principio es también posible hacer difundir sustancias exógenas del medio de perfusión hacia el espacio extracelular (Ungerstedt, 1984).

Una diferencia importante entre la diálisis intracerebral y otros métodos de perfusión "in vivo" es que el tejido cerebral no es expuesto al fluido en movimiento. Se han realizado varios estudios histológicos que muestran que, en situaciones agudas, el daño al tejido vecino a la membrana de diálisis es mínimo (Sandberg & Lindstrom, 1983; Hamberger, 1984; Imperato & DiChiara, 1984), también se ha comprobado que la diálisis no afecta la barrera hemato-encefálica (Tosman & Ungerstedt, 1986).

La hipótesis de este trabajo implica la idea de que las estructuras de los ganglios basales se encuentran unidas funcionalmente por vías GABAérgicas, como un cadena, para conducir la información motora dependiente de la estimulación dopaminérgica nigro-estriatal. Considerando al GABA como un neurotransmisor inhibitor se propone en principio, que la mayor actividad celular en un núcleo llevaría a la liberación de GABA en el núcleo con la que las células conectan, produciendo ahí una inhibición lo que se traduciría en una desinhibición en la estructura siguiente en la cadena, la que nuevamente mostraría mayor actividad celular y así sucesivamente.

Para probar esta hipótesis se decidió observar entonces la actividad de la enzima de síntesis del GABA (GAD) y la liberación

"in vivo" del GABA como reflejo de la actividad de las células GABAérgicas en el St, GP, EP y SN subsiguientes a la denervación dopaminérgica nigro-estriatal obtenida mediante la inyección estereotáxica de 6-OHDA en el haz del cerebro medio anterior.

2. METODOS Y PROCEDIMIENTOS

Lesión y prueba conductual

Animales de experimentación.

Se utilizaron, para los experimentos de actividad enzimática, ratas Wistar macho que pesaban entre 220 y 250 g al inicio del experimento. Para los experimentos de liberación se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho con pesos de 140 a 160 g al comenzar los experimentos.

Los animales, de 4 a 6 por jaula, tenían un ciclo luz-obscuridad de 12 horas. Las ratas tenían acceso "ad libitum" al agua y al alimento.

Lesión estereotáxica

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de 95% O₂-5% CO₂ y halotano (2%) y montados en un aparato estereotáxico (David Kopf). Se hicieron inyecciones unilaterales de 6-OHDA (8 ug 6-OHDA-HCl, disuelto en 4 ug de salina conteniendo 0.2% de ascorbato) usando una microjeringa Hamilton de 5 ul. Las coordenadas estereotáxicas (posterior, lateral y vertical) fueron: 1.7 , 1.5 y 8.7 y 4.4, 1.2 y 7.8 mm para las ratas Wistar y Sprague-Dawley respectivamente. La sutura Bregma se empleó como referencia para las coordenadas estereotáxicas antero-posterior y lateral; la vertical se determinó a partir de la superficie cortical. Una vez determinadas las coordenadas

antero-posterior y lateral se hizo el trépano, y, con la jeringa colocada en un micromanipulador, y, a partir, de la superficie del cerebro, la aguja fue introducida en el cerebro. La velocidad de inyección fue de un microlitro cada 30 segundos y una vez inyectados los 4 microlitros se dejó la jeringa en posición por otros 3 a 5 minutos para permitir la difusión de la neurotoxina.

Prueba Conductual

Para escoger a las ratas exitosamente denervadas se usó la prueba conductual de observación y cuantificación de la conducta de giro (Ungerstedt & Herrera-Marschitz, 1981). Las ratas que giran más de 100 veces hacia el lado contralateral a la lesión de 6-OHDA en los 30 minutos inmediatos a la inyección sistémica de apomorfina, se considera que han sido denervadas en más de un 80% de las células dopaminérgicas conforme a los reportes en la literatura (Creese et al, 1977; Mitchell & Redgrave, 1980).

Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con apomorfina (Apoteksbolaget, 0.25 o 0.05 mg/kg) y colocadas en un campo abierto. El número de giros se contabilizó manualmente o empleando un rotámetro.

De esta manera se escogieron las ratas que giraron más de 100 veces en el periodo de 30 minutos. Para la medición de la actividad enzimática se hicieron dos grupos de animales, uno que sobrevivió 4 semanas y otro 8. Para los experimentos de liberación "in vivo" los animales sobrevivieron 4 semanas. Como controles se usaron sujetos sin ningún tratamiento previo.

Experimentos "in vitro"

Dissección

Para los experimentos "in vitro", las ratas fueron sacrificadas por dislocación cerebral; los cerebros fueron extraídos rápidamente y lavados en solución salina fría. A continuación se sacaron rebanadas de 1 mm de espesor, manteniendo el cerebro y el dispositivo de corte en hielo, habiendo sido este último enfriado previamente. El St, GP y la SN por su gran tamaño y fácil acceso, fueron extraídos usando bisturí, tijeras y pinzas para iris curvas. El EP fue extraído con un "saca-bocados". Las estructuras fueron secadas con papel filtro, pesadas y guardadas en nitrógeno líquido hasta por una semana. En algunas ocasiones el ensayo de la GAD se realizó inmediatamente después de la dissección. No se hayaron diferencias entre ambos procedimientos.

Debido al tamaño y peso de las estructuras para el St se tomó de un sólo sujeto, para las demás áreas se tomaron estructuras de tres animales, de las que se hicieron "pools".

El tiempo de la dissección no excedió nunca los 6 minutos.

Determinación de la actividad de la GAD

La actividad de la GAD fue medida, con una modificación (Pérez de la Mora et al, 1977b) del método radiométrico de Albers y Brady (1959).

Los fragmentos de tejido fueron homogeneizados con un mazo de teflon; en hielo, en un buffer de fosfato de sodio 5.7×10^{-2} M (Baker), pH = 6.4, que contenía 10^{-3} M de fosfato de piridoxal

(Sigma), 10^{-4} M de borhidrato de bromuro de 2-amino etil isotiocuronio (Sigma) y 0.5% (v/v) de Triton X-100 (Sigma) (concentraciones finales).

La reacción comenzó cuando se pusieron en contacto, en un tubo de vidrio de 3 mm de diámetro interno, 85 μ l del homogenado de cerebro, con 15 μ l de ácido glutámico 25 mM, 0.04 μ Ci/mmol, DL(1-14C) (New England Nuclear), pH=7.

Los tubos de vidrio con la mezcla de reacción se conectaron con tubos similares que contenían 0.2 ml de hidróxido de hiamina (New England Nuclear) por medio de una unión de un tubo de hule. El período de incubación fue de 40 minutos, a 37 C, en un baño de agua y con agitación continua. La reacción se detuvo al inyectar, a través del hule, 0.2 ml de ácido sulfúrico 3.8 N.

Para asegurarse que todo el CO₂ fuera atrapado por la hiamina la incubación se continuó en un horno, durante 90 minutos a 60 C. Posteriormente los tubos fueron colocados en viales de centelleo que contenían 10 ml de mezcla de centelleo (4 g de 2,5 difenil oxazol (Sigma) y 50 mg de p-bis-(2-(5 fenil oxazolil) benceno (Sigma) en 1 litro de tolueno (Merck)).

El hidróxido de hiamina se mezcló con el líquido de centelleo usando una vara de vidrio que se introdujo varias veces dentro del tubo. Los viales fueron almacenados en la oscuridad para evitar la quimioluminiscencia y contados al día siguiente en un espectrómetro de centelleo Packard-TriCarb 300.

Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron siguiendo el método de Lowry et al (1951).

Contenido de dopamina y actividad de la CAT

Para comprobar la efectividad de la lesión, se usaron seis ratas que habían girado más de 100 veces/30 minutos en las que se midió la concentración de dopamina en el St. La concentración se determinó empleando cromatografía líquida (HPLC) con detección electroquímica (Keller et al, 1976), se uso un St para cada determinación.

Con objeto de estudiar la posible función de la acetilcolina en la integración estriatal se midió la actividad de la CAT en 5 ratas denervadas, a las 4 semanas de la lesión con 6-OHDA. La CAT fue determinada usando el método radioisotópico de Fonnum (1975).

Experimentos "in vivo"

Animales control (270-320 g) o ratas 4 semanas después de la lesión con 6-OHDA, fueron anestesiadas con halotano (2%, 95% O₂-5% CO₂) y montadas en un aparato estereotáxico (David Kopf). Se expuso el cráneo y se hicieron dos pequeños trépanos bilateralmente para permitir la implantación de las cánulas de diálisis en ambos estriados y globos pálidos (-0.2, 2.75 y -6.5 mm, estriados y -1.3, 3 y 7 mm, globos palidos, posterior, lateral y vertical respectivamente) con relación a Bregma. Las coordenadas se escogieron según el atlas de Paxinos y Watson (1982).

Para la perfusión se utilizaron cánulas (Carnegie Medicin, AB) cuya membrana de diálisis se encuentra pegada a una cánula de acero y sellada con epoxy en la punta. Una cánula interna más delgada lleva el fluido al fondo de la cánula donde

sale del capilar interno fluye hacia arriba y sale por un tubo lateral (Ungerstedt, 1984).

La membrana de la cánula tiene un corte de peso molecular de 20000 y unas dimensiones de 2 mm de largo por 0.52 mm de diámetro.

Las cánulas implantadas fueron mantenidas en posición gracias a un micromanipulador estereotáxico y perfundidas continuamente con solución Ringer (Aco Lakemedel) que contenía: 147 mmolas Na^+ , 155.6 mmolas Cl^- , 4 mmolas K^+ y 2.3 mmolas Ca^{2+} , $\text{pH}=6$; a una velocidad de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ con una bomba de microinfusión continua (Carnegie Medicin, AB).

Una vez implantadas las cánulas se perfundió durante 30 minutos para que se estableciera una línea basal. A partir de los 30 minutos se recolectaron las muestras cada 10 minutos (20 μl), durante 60 minutos. Se añadió KCl 100 mM, en la última fracción de 10 minutos.

Al terminar el experimento los animales fueron sacrificados con una sobredosis de anestesia y el cerebro se extrajo para realizar el análisis histológico. Las secciones (100 μm) fueron cortadas en un microtomo de congelación para comprobar la localización de las cánulas.

Los perfusados fueron analizados para GABA usando cromatografía líquida (HPLC) con detección fluorométrica después de la derivatización con o-ftadialdehido, según el método de Lindroth y Mopper (1979). El perfusado y el buffer de borato se hicieron reaccionar durante 1 minuto, luego fueron inyectados automáticamente (WISP 710-B, Waters Assoc) en el sistema de

bombeo (Spectra-Physics SF 8700).

El GABA fue separado por cromatografía de fase reversa usando resina Nucleosil, con partículas de 5 μm (Magery-Nagel), empacada en una columna de acero de 200 x 4.6 mm. El GABA era eluido empleando un gradiente de buffer fosfato 5 x 10⁻² M (Merck) pH=5.3 y metanol (LabScan).

Se usó un detector de fluorescencia (Schoeffeld FS 970) cuya longitud de la onda de excitación fue de 330 nm y la de emisión de 420 nm. Los resultados fueron analizados automáticamente usando un integrador de la señal (LDC/Milton Roy CI-10).

El límite de detección fue de aproximadamente 100 pmolas. El standard para calibración fue una solución de GABA que contenía 25 pmolas (Sigma).

Por pruebas "in vitro" (25 pmolas, 2 μl) se determinó que la recuperación de GABA a través de la membrana de diálisis era del 15 al 20%.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan, para la actividad enzimática, como la media del cociente del lado experimental / control \pm el error standard de la media (SEM). Los resultados de la liberación "in vivo" se expresan como pmolas/10 μl de perfusado, media \pm SEM.

Se empleó la prueba t de Student para estimar los valores de significancia.

3. RESULTADOS

Actividad de la GAD

La actividad de la GAD en el control no lesionado es similar al control de los hemisferios. La media del cociente entre ambos lados fue de 1.00 ± 0.1 . Considerando cada una de las estructuras la relación entre hemisferios varió de 0.93 a 1.12 (Fig. 1). Los valores de la actividad enzimática se encuentran expresados en nmolas/hr/g de proteína (Tabla I).

Cuatro semanas después de la lesión unilateral con 6-OHDA el cociente de la actividad de la GAD aumentó significativamente en el St ($p < 0.02$), GP y SN ($p < 0.05$) (10, 41 y 38% respectivamente). En el lado contralateral el EF mostró un decremento significativo (SEM) ($p < 0.02$), en la relación lado experimental/control.

A las ocho semanas la actividad enzimática regresó a valores control en el St y en el GP y el efecto se invirtió en la SN, donde se observó un decremento significativo ($p < 0.01$). En el lado contralateral a las ocho semanas, solamente el GP mostró un decremento significativo ($p < 0.02$).

Para ver el efecto de la congelación del tejido sobre la actividad de la GAD, se extrajeron cerebros de animales no lesionados, los cuales fueron seccionados sagitalmente por la mitad, una de las partes fue homogenizada inmediatamente y la prueba de la actividad de la GAD se realizó inmediatamente como ya se describió, la otra mitad se guardó en nitrógeno líquido durante una semana. Los resultados fueron, expresados, en nmolas/hr/g de tejido húmedo + SEM, de 75 ± 18 para el tejido no congelado y de 78 ± 7 para el no congelado ($n=3$), lo que muestra

que no hay diferencia.

Se midió la concentración de dopamina en 6 ratas que cumplieron con los criterios conductuales y que tenían tiempo de sobrevivencia de 4 semanas. La concentración de dopamina en el lado intacto fue de 12.0 ± 3.1 ng/g de tejido húmedo, mientras que en el lado lesionado fue de 0.3 ± 0.1 ng/g de tejido húmedo, indicando una disminución del 98%.

La actividad de la CAT también fue estimada 4 semanas después de la lesión de la SN. La actividad de la enzima, expresada en nmolas/g de tejido húmedo/ 15 minutos, fue de 369 ± 121 para el lado intacto y de 429 ± 162 para el lado lesionado, mostrando un incremento no significativo del 14% en el lado lesionado.

Liberación de GABA

Para los experimentos "in vivo" los sujetos tuvieron un tiempo de sobrevivencia de 4 semanas, las ratas fueron seleccionadas usando los mismos criterios conductuales que los empleados en los experimentos de la actividad enzimática.

No se encontró variación en la liberación "in vivo" de GABA en el St entre ambos hemisferios ni en la basal, 1.47 ± 0.26 , contra 1.72 ± 0.33 (todos los resultados son en pmolas/10 μ l de perfusado \pm SEM), ni en la liberación estimulada con K^+ (Ver Tabla II). En los sujetos lesionados sin embargo, si se vio un aumento significativo ($p < 0.05$) en la liberación del lado lesionado con respecto al control, es decir, 4.44 ± 1.56 contra 1.47 ± 0.26 . El lado contralateral a la lesión no sufrió efecto, siendo los valores 1.49 ± 0.26 contra 1.72 ± 0.33 del control.

Por otra parte, la liberación estimulada en el lado ipsilateral a la lesión mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto al control, 220.3 ± 50.8 contra 112.9 ± 26.4 , mientras que en el lado opuesto se observó una disminución significativa ($p < 0.01$) en la liberación estimulada con respecto al control, 58.5 ± 9.8 contra 165.1 ± 28.8 .

En el caso del GP se observó que no existía variación entre ambos hemisferios en sujetos control ni en la liberación basal, 1.78 ± 0.11 contra 1.89 ± 0.17 , ni en la estimulada 63.9 ± 9.3 contra 80.12 ± 10.7 . En los animales lesionados se encuentra, en la basal, un ligero aumento en la liberación del lado lesionado con respecto al control, pero que no es significativa, 2.54 ± 0.42 contra 1.78 ± 0.11 , y en el lado contralateral una pequeña disminución que tampoco es significativa, 1.53 ± 0.34 contra 1.89 ± 0.17 . En los animales lesionados el lado ipsilateral a la lesión muestra un ligero aumento en la liberación estimulada con respecto al control que tampoco es significativo, 81.7 ± 17.9 contra 63.6 ± 9.3 . En el lado contralateral se observó una disminución significativa ($p < 0.01$) en la liberación estimulada contra el control, 33.66 ± 6.4 contra 80.12 ± 10.7 .

TABLA I

ACTIVIDAD DE LA GAD

TIEMPO DE SOBREVIVENCIA 4 SEMANAS

ESTRUCTURAS	GRUPO CONTROL		
	LESIONADO	NO LESIONADO	
ESTRIADO	68(16)(8)	95(21)(2)	65(8)(4)
GLOBO PALIDO	251(30)(4)	354(74)(5)	254(28)(6)
ENTOPEDUNCULAR	180(34)(4)	194(25)(4)	114(7)(4)
SUBSTANTIA NIGRA	347(46)(4)	478(40)(6)	377(56)(6)

TIEMPO DE SOBREVIVENCIA 8 SEMANAS

ESTRUCTURAS	GRUPO CONTROL		
	LESIONADO	NO LESIONADO	
ESTRIADO	68(16)(8)	66(7)(4)	57(4)(4)
GLOBO PALIDO	251(30)(4)	218(17)(5)	186(10)(5)
ENTOPEDUNCULAR	180(34)(4)	215(46)(5)	119(39)(4)
SUBSTANTIA NIGRA	347(46)(4)	204(21)(5)	289(15)(5)

Los resultados estan expresados como la media \pm (SEM) (n) de nmolas/hr/mg proteina. Ya que los valores de ambos lados del cerebro en el grupo control no vario los datos se juntaron en una media. Los datos del estriado son de un solo animal, los demas son de pooles de 3 animales.

TABLA II

Liberación "in vivo" de GABA

Cuerpo estriado

	Ipsilateral	Contralateral
Control	1.47 ± 0.26	1.72 ± 0.33
Lesionado	4.44 ± 1.56*	1.49 ± 0.26
Control + KCl	112.9 ± 26.4	165.1 ± 28.8
Lesionado + KCl	220.3 ± 50.8*	58.5 ± 9.8**

Globo pálido

	Ipsilateral	Contralateral
Control	1.78 ± 0.11	1.89 ± 0.17
Lesionado	2.54 ± 0.42	1.53 ± 0.34
Control + KCl	63.6 ± 9.3	80.12 ± 10.7
Lesionado + KCl	81.7 ± 17.9	33.66 ± 6.4**

Los resultados se expresan como pmolas/10 ul de perfusado, media ± SEM. Los valores fueron corregidos con la recuperación "in vitro". La liberación fue estimulada con 100 mM KCl. La prueba t de Student fue empleada para estimar la significancia. * p < 0.05, ** p < 0.001. n = 5 - 12.

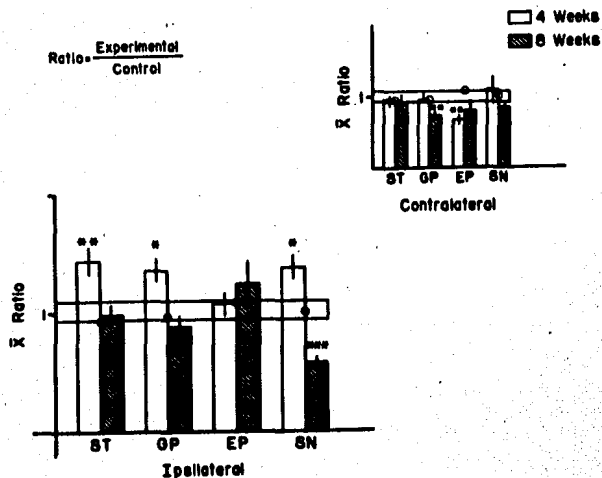


Fig 1. La barra horizontal indica la media del cociente del lado experimental/valor control \pm SEM, para cada estructura a las 4 (barras abiertas) y 8 semanas (barras estriadas). La prueba t de Student fue empleada para estimar la significancia. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.01$. $n = 4-8$.
 St = Cuerpo estriado; GP = Globo palido; EP = Nucleo entopeduncular; SN = Substantia nigra.

4 DISCUSION

Actividad de la GAD

Los resultados presentados muestran que la actividad de la GAD en el St, GP y SN ipsilaterales a la lesión con 6-OHDA varia con el tiempo de sobrevivencia después de la lesión. A las 4 semanas se observa un incremento en la actividad enzimática en St, GP, y SN ipsilaterales a la lesión mientras que en el EP contralateral disminuye su actividad. El aumento observado en el St es acorde con resultados previos en sujetos que sufrieron lesiones equivalentes (Vincent et al, 1976; Gale & Casu, 1981) o por el bloqueo crónico de los receptores a dopamina (Mao et al, 1977; Marco et al, 1978). Se ha propuesto que las células del St reciben una inhibición dopaminérgica tónica. Se ha observado que la actividad de las células aumenta inmediatamente después de la denervación dopaminérgica estriatal (Arbutnott, 1974; Schultz & Ungerstedt, 1978). Los resultados de la actividad de la GAD en el St a las 4 semanas podrían indicar que las células GABAérgicas se encuentran más activas después de que la inhibición tónica dopaminérgica ha sido eliminada.

Como ya se revisó anteriormente (ver Función del GABA) se ha expuesto la posibilidad de que sean las neuronas dopaminérgicas las que hicieran sinapsis, ya fuera sobre interneuronas GABAérgicas o colinérgicas, las cuales controlarían la actividad de las células estriatales que proyectan hacia el GP y la SN. Si este fuera el caso al perderse la aferencia dopaminérgica estas interneuronas se desinhibirían y, por lo tanto, al encontrarse

más activas se podría predecir que disminuiría la actividad de las células que proyectan hacia el GP y la SN. De esta forma se esperaría que la actividad de la GAD disminuyera en el GP y en la SN. Los resultados, sin embargo, muestran que esto no sucede ya que se observa un aumento en la actividad enzimática en el GP y en la SN. Podría, por tanto, sugerirse que el aumento en el St es causado por la desinhibición de las interneuronas GABAérgicas y que el aumento en el GP y la SN es debido a la desinhibición de las neuronas eferentes estriatales ya que si las interneuronas aumentaran su actividad e hicieran sinapsis en las eferentes estriatales, se esperaría que la actividad de estas últimas disminuyera al encontrarse más inhibidas. Esto sugeriría que la dopamina tiene efecto en dos poblaciones diferentes de células GABAérgicas, aunque no puede descartarse la posibilidad de que el aumento en la actividad de la GAD en el St se relacione con la GAD que se encuentra en los cuerpos celulares de las neuronas que proyectan al GP y a la SN.

Con esto se sugiere que es posible que el control dopaminérgico sobre las células GABAérgicas eferentes sea directo y no mediado a través de interneuronas GABAérgicas como ha sido propuesto (Gale & Casu, 1981). Al suceder los cambios compensadores, no se puede descartar que suceda alguna alteración entre ambas poblaciones y que entonces sí se establezca una relación GABAérgica intraestriatal, es decir, que en este caso se establezca una unión directa entre las interneuronas GABAérgicas y las células GABAérgicas eferentes.

La reversión del efecto a las 8 semanas después de la lesión

puede deberse a algún mecanismo plástico que podría relacionarse con el surgimiento de nuevas terminales de las fibras dopaminérgicas provenientes del hemisferio contralateral. Fritzel et al, (1983a) y Consolazione et al (1985) han observado que existe una vía dopaminérgica nigroestriatal interhemisférica.

Recientemente se ha reportado que una lesión de la SN demuestra la existencia de cambios en el número de fibras que proyectan hacia el St contralateral; este cambio es bifásico, ya que a las tres semanas se encuentra el aumento máximo en el incremento y a los 90 días la proyección interhemisférica ha vuelto a valores control (Fritzel et al, 1983b).

Se puede, por tanto, proponer un mecanismo compensador para el control de las neuronas GABAérgicas que entraría en acción entre 4 y 8 semanas después de la lesión con 6-OHDA. Se puede sugerir que algún proceso plástico tiene lugar a nivel del St para inducir en el lado ipsilateral el regreso a valores control de la actividad de la GAD en el St y el GF y un decremento significativo en la SN.

Se han reportado varios cambios plásticos bifásicos en el St por la denervación dopaminérgica. Así, se ha observado una disminución en el contenido de acetilcolina 9 días después de la lesión con 6-OHDA, pero a los 30 días se encontraba otra vez en niveles control (Garatini et al, 1980); también se ha observado que el número de sitios de unión para (3H) atropina se encuentra disminuido a los 7 y 14 días posteriores a la lesión con 6-OHDA, pero que a los 20 días se encuentra a niveles normales otra vez (Kato et al, 1978). Tal vez ésta sea la razón por la que no encontramos cambios significativos en la actividad de la CAT 4

semanas después de la lesión.

Por otra parte, se ha visto que la denervación dopaminérgica con 6-OHDA provoca un incremento en la actividad eléctrica espontánea solamente durante un fase inicial y un proceso adaptativo ocurre subsiguientemente (Arbuthnot, 1974; Schultz & Ungerstedt, 1978).

También se han reportado asimetrías posturales debidas a lesiones de la SN con 6-OHDA o ácido kainico que cesan pocos días después de la operación (DiChiara et al, 1979; García-Muñoz et al, 1983), indicando que alguna clase de compensación ha ocurrido.

En el hemisferio contralateral a la lesión con 6-OHDA se encontró una disminución significativa en la actividad de la GAD en el EP y en el GP después de 4 y 8 semanas respectivamente. Esto puede deberse al efecto simultáneo de conexiones contralaterales como, por ejemplo, el St o la SN (McGeer et al, 1984).

La técnica de la utilización de glucosa ha mostrado que la actividad metabólica en el GP, EP y SN son afectadas en paralelo en respuesta a la estimulación dopaminérgica (Brown & Wolfson, 1978; Wooten & Collins, 1983). Los resultados que presentamos son específicos en su relación con la actividad de la GAD, mientras que con la técnica de la deoxiglucosa, no se pueden detectar cambios en un neurotransmisor dado.

Aumentos en la actividad enzimática por periodos cortos después de la deafferentación como los que reportamos aquí, pueden deberse al resurgimiento del campo terminal (Stachowiack et al,

1984), pero también podrían deberse a un aumento en la afinidad de la enzima por su co-factor (Miller & Walters, 1979) o a un aumento en la producción de la enzima (Thoenen, 1974). La actividad de la GAD fue medida bajo concentraciones saturantes de co-factor, por lo tanto, nuestras estimaciones no pueden excluir la primera posibilidad.

Hay evidencia que sugiere que la depolarización y subsecuente liberación de GABA, desplaza el balance de un mecanismo de retroalimentación que controla directamente la síntesis presináptica de GABA, lo que conduce a la formación de una mayor proporción de GAD activa (Porter & Martin, 1984). Ya se habían revisado (ver Sección 2) experimentos que indicaban que la depolarización por alto K^+ aumentaba la actividad de la enzima (Gold & Roth, 1979). Por lo tanto un incremento en la síntesis de GAD es otra posible explicación.

Aumentos en la actividad catalítica de una enzima han sido reportados en otras neuronas como un mecanismo por medio del cual el sistema nervioso compensa alteraciones funcionales, a pesar de un daño neuronal extenso, aumentando la liberación de neurotransmisor de las células no afectadas, lo que se encuentra acompañado de un aumento en la actividad de las células (Thoenen, 1974). Así, por ejemplo, la actividad de la tirosina hidroxilasa en las células cromafines de la glándula suprarrenal aumenta después de la destrucción de las terminales simpáticas post-ganglionares (Thoenen et al, 1969). La actividad de la tirosina hidroxilasa también aumenta después de la destrucción parcial de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal (Acherson et al, 1979).

En resumen, los experimentos reportados en esta tesis muestran cambios ipsilaterales en la actividad de la GAD en el St, GP y SN después de la denervación dopaminérgica del St. A tiempos más largos se observa una reversión del efecto. Estos cambios probablemente reflejen una compensación a largo plazo en las sinapsis GABAérgicas como resultado de la pérdida de la inervación dopaminérgica. Es posible pues, proponer que los cambios observados en función del tiempo en la actividad enzimática que suceden entre las 4 y las 8 semanas posteriores a la lesión revelen la presencia de un proceso fisiológico compensador, probablemente relacionado con los cambios en las conexiones dopaminérgicas interhemisféricas.

Liberación de GABA

Desde que se reportó que drogas que afectaban la transmisión dopaminérgica nigral producían cambios asimétricos en la liberación de dopamina en ambos hemisferios (Leviel et al, 1979), se despertó un gran interés por estudiar la relación de los dos hemisferios en la neurotransmisión de los ganglios basales.

Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la liberación de GABA en el St ipsilateral, a las 4 semanas de la lesión, comparado con los controles, tanto en la liberación espontánea como en la estimulada con K+, lo cual está de acuerdo con los aumentos en la actividad de la GAD observados previamente en nuestros experimentos, así como los reportados en la literatura (Vincent et al, 1978; Gale & Casu, 1981) y con el

aumento en la cantidad de GABA encontrado en animales lesionados con 6-OHDA (Perry et al, 1983). En el St del lado contralateral a la lesión se encontró una disminución significativa en la liberación de GABA estimulada con alto K⁺. Esto es una prueba más en apoyo de la idea de la influencia de la dopamina en la liberación de GABA a nivel interhemisférico. Se ha demostrado que hay un aumento en la liberación de dopamina en el lado contralateral a la lesión con 6-OHDA, tanto estimulado como en una preparación crónica (Nieouillon et al, 1977; Zetterstrom et al, en prensa), lo cual sugeriría que se encontraría una mayor inhibición en el lado no lesionado, que, de hecho se encontró, al observar una menor liberación de GABA.

En el GP se encontró un ligero aumento en la liberación tanto basal como la estimulada por K⁺, lo cual se encuentra en acuerdo con estudios que muestran un aumento en la utilización de GABA provocado por el bloqueo con neurolepticos (Mao et al, 1977; Marco et al, 1978). La liberación espontánea y estimulada de (3H) GABA ha sido observada en el GP del gato (Besson et al, 1981; Korf et al, 1981). También se ha visto que la estimulación eléctrica del St provoca un aumento en la liberación de (3H) GABA en ambos GP (Besson et al, 1981). Estos resultados sugieren la existencia de procesos que contribuyen a la regulación de las sinapsis GABAérgicas en el St y GP no sólo en el lado ipsilateral sino también en el lado contralateral.

El decremento significativo en la liberación de GABA en el GP contralateral a la lesión aún después del pulso depolarizante con K⁺, visto en estos experimentos, también sugiere la existencia de mecanismos reguladores recíprocos entre el St y el

GP en ambos hemisferios.

Resultados preliminares (Sagovia et al, 1986) mostraban un marcado descenso en la liberación basal en el GP contralateral a la lesión. Estudios posteriores, aquí presentados, demostraron que, de hecho, la liberación en el GP contralateral es tan sólo ligeramente inferior a la basal y que no es significativa. Las diferencias pueden achacarse tanto al pequeño pico de la cromatografía, que puede ser fácilmente enmascarado por el ruido, como debido a la localización de las cónulas que pueden abarcar más del área del GP como, sobre todo, a los tratamientos a los que fueron sometidas las primeras membranas de diálisis, que afectaban la recuperación del aminoácido.

Se ha observado que aunque se aumente la cantidad total de GABA por la inhibición de la GABA-T si la actividad de la GAD se disminuye, ocurren convulsiones lo que sugiere que es el GABA recién sintetizado el que se encuentra relacionado con la función sináptica (Tapia, Sandoval & Contreras, 1975); también se ha reportado que la presencia del ácido 3-mercaptopropiónico (inhibidor de la GAD) en el medio de perfusión reduce la liberación de GABA (Korf et al, 1981; van der Hayden et al, 1980) sugiriendo una íntima relación entre la síntesis de GABA y su liberación. En nuestros experimentos fue posible observar una relación entre el aumento de la actividad de la GAD y la liberación de GABA, tanto basal como estimulado, en el St ipsilateral a la lesión, mientras que en la liberación en el lado contralateral se observó una disminución en la liberación estimulada y no se detectaron cambios en la actividad enzimática.

Algo similar se vio en el GP donde en el lado ipsilateral se observaron incrementos tanto en la actividad de la GAD como en la liberación, aunque esta última no fue significativa. La liberación basal en el GP contralateral no fue afectada, mientras que la estimulada con alto K^+ se vio marcadamente reducida, mientras que en la actividad de la GAD no se observaron cambios.

Es difícil interpretar la relación entre la actividad de la enzima medida "in vitro", bajo concentraciones saturantes de co-factor y la liberación "in vivo". En los trabajos de Korf et al y van der Heyden et al que acabamos de mencionar se administró el inhibidor de la enzima y la liberación se midió simultáneamente, mientras que en estos experimentos la actividad de la enzima se midió 4 semanas después de la lesión y, por tanto, es factible pensar que factores reguladores de la actividad enzimática hayan entrado en juego. Por otra parte, se puede observar que cuando la actividad enzimática se encuentra elevada la liberación también lo está, mientras que cuando no se ve cambio en la actividad de la GAD se ve una disminución en la liberación estimulada, de lo que se puede sugerir que tal vez bajo las condiciones del ensayo se pueda establecer una especie de actividad mínima que tal vez no tenga gran relevancia fisiológica, mientras que la liberación estimulada sea el reflejo más fiel de la actividad relacionada con la transmisión sináptica. Observaciones obtenidas en nuestro laboratorio sugieren que la liberación basal de GABA es similar en diversas regiones del cerebro, y que es la estimulada con alto K^+ la que revela diferencias significativas, esto sugiere que el GABA liberado por la estimulación puede ser el que se encuentra relacionado con la transmisión sináptica y que sea el recién

sintetizado.

Los resultados de estos experimentos muestran que, aunque en sujetos control, la liberación de GABA, tanto basal como estimulada, en el St y GP es igual en ambos hemisferios, la reducción en los niveles de dopamina en un St produce un incremento en la liberación de GABA en el St y en el GP ipsilaterales a la lesión, el cual es incrementado por la depolarización con alto K⁺, mientras que se encuentra un marcado decremento en la liberación estimulada en el GP contralateral. Esto sugiere que la liberación de GABA en el St y el GP se encuentra sujeta a un control por parte de las terminales dopaminérgicas del St y que existe algún tipo de comunicación entre ambos hemisferios.

En general, se puede concluir que la actividad de las neuronas GABAérgicas en el St, GP y SN se encuentra regulada por las terminales dopaminérgicas nigro-estriatales, tanto ipsi como contralaterales y que existe un mecanismo plástico para compensar los efectos de la denervación dopaminérgica.

Existen algunos experimentos que se antojaría hacer para continuar esta investigación. Tal vez el más obvio sería hacer los mismos experimentos pero a tiempos más largos, de 3 a 6 meses, por ejemplo, para ver si se estabiliza la compensación. Otro experimento interesante y factible sería medir la liberación "in vivo", los niveles de GABA en el tejido y la actividad de la GAD en el mismo sujeto para entonces poder relacionar directamente la actividad enzimática con los niveles de GABA total y con la liberación, especialmente la estimulada con alto

K+, que probablemente es la del GABA recién sintetizado.

Por otra parte, para comprobar si el efecto compensador es debido al surgimiento de fibras del lado contralateral, sería interesante bloquear la comunicación dopaminérgica en ambos hemisferios con un tratamiento prolongado con neurolepticos o por la destrucción de ambas SN con 6-OHDA o con MPTP (1, metil-4, fenil-1,2,5,6, tetrahidropiridina).

III REFERENCIAS

- Acherson, A.L., Zigmond, M.J. and Stricker, E.M. Short and long term changes in tyrosine-hydroxylase activity in rat brain after subtotal destruction of noradrenergic neurons. *J. Neurosci.* 1, 493-505, (1979).
- Adinolfi, A.M. and Pappas, G.D. The fine structure of the caudate nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 133, 167-84, (1968).
- Aghajanian, G.K. and Bunney, B. In: *Frontiers of catecholamine research*. Usdin, E. and Snyder, S.H. (Eds). Pergamon Press (1973).
- Albers, R.W. and Brady, R. The distribution of glutamic decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J. Biol.Chem.* 234, 926-29, (1959).
- Alderman, J.L. and Schelleberg, J. -aminobutyric acid (GABA) in the rat brain: re-evaluation of sampling procedures and post-mortem increase. *J. Neurochem.* 22, 937-40, (1974).
- Arbuthnott, G.W. and Crow, T.J. Relations of contraversive turning to unilateral release of dopamine from the nigrostriatal pathway in rats. *Exp. Neurol.* 30, 484-91, (1971).
- Arbuthnott, G.W. Spontaneous activity of single units in the striatum after unilateral destruction of dopamine input. *J. Physiol.* 399, 121, (1974).
- Arnt, J. and Scheel-Kruger, J. GABAergic and glycinergic mechanisms within the substantia nigra. *Psychopharmacol.* 62, 267-77, (1979).
- Azmitia, E.C. and Segal, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and medial raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179, 641-68, (1978).
- Balasz, R., Machiyama, Y., Hammond, B.J., Julian, T. and Richter, D. The operation of the gamma-aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue "in vitro". *Biochem. J.* 116, 445-67, (1970).
- Bartholini, G. Interaction of striatal dopaminergic, cholinergic and gaba-ergic neurons: relation to extrapyramidal functional. *Trends in Pharmacol. Sci.* Jan 1980
- Baxter, F.C. Some recent advances in studies of GABA metabolism and compartment. In: *GABA in nervous system function*. Roberts, E., Chase, T.N. and Tower, D.B. (Eds). Raven Press (1976).

Belin, M.F., Gamrani, H., Aguera, M., Salas, A. and Pujol, J.F. Selective uptake of 3H-aminobutyrate by rat supra and subpendymal nerve fibers. Histological and high resolution radioautographic studies. *Neurosci.* 5, 241-54, (1980).

Besson, M.J., Gauchy, C., Kemel, M.L. and Glowinsky, J. In vivo release of 3H-GABA synthesized from 3H-glutamine in the substantia nigra and the pallido-entopeduncular nuclei in the cat. In: DiChiara, G. and Bessa, G.L. (Eds). GABA and the basal ganglia. Raven Press (1981).

Besson, M.J., Kemel, M.L., Gauchy, and Glowinsky, J. Bilateral asymmetrical changes in the nigral release of (3H)GABA induced by unilateral application of acetylcholine in the cat caudate nucleus. *Brain Res.* 241, 241-48, (1982).

Blinderman, J.M., Maitre, M. and Mandel, P. Studies on glutamate decarboxylase of the mammalian brain. In: GABA: biochemistry and central nervous system function. Mandel, P. and DeFeudis, F. (Eds). Plenum Press (1979).

Blowers, A.J. and Borison, R.L. Dyskinesias in the geriatric population. *Brain Res. Bull.* 11, 175-79, (1983).

Bradley, K. Diseases of the basal ganglia. In: The basal ganglia: structure and function. McKenzie, J.S., Kenin, R.E. and Wilcock, L.N. (Eds). *Adv. Behav. Biol.* Vol 27. Plenum Press (1984).

Brodal, A. Neurological Anatomy in relation to clinical medicine. Oxford University Press (1981).

Brown, L.L. and Wolfson, L.J. Apomorphine increases glucose utilization in the substantia nigra, subthalamic nucleus and corpus striatum of rat. *Brain Res.* 140, 182-93, (1978).

Brownstein, J.M., Mroz, E.A., Tappaz, M. and Leeman, S.E. On the origin of substance P and glutamic acid decarboxylase (GAD) in the substantia nigra. *Brain Res.* 135, 315-23, (1977).

Bunney, B.S. and Aghajanian, G.K. The precise localization of nigral afferents in the rat as determined by a retrograde tracing technique. *Brain Res.* 104, 223-40, (1976).

Carlsson, A. and Lindquist, M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetamphetamine in mouse brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 20, 140-44, (1963).

Carpenter, B.M. Anatomy of the corpus striatum and brain stem integrating systems. In: Handbook of physiology. Vol II. Part 2. American Physiological Society (1981).

Carpenter, B.M. Interconnections between the corpus striatum and brain stem nuclei. In: The basal ganglia structure and function. McKenzie, J.S., Kenin, R.E. and Wilcock, L.N. (Eds). Plenum Press (1984).

Carter, D.A. and Fibiger, G.H. The projections of the entopeduncular nucleus and globus pallidus in the rat as demonstrated by autoradiography and horseradish peroxidase histochemistry. *J. Comp. Neurol.* 177,110-24, (1978).

Clark, R.M. and Collins, G.G.S. The release of endogenous amino acids from the rat visual cortex. *J. Physiol. (Lond)*, 262, 383-400, (1976).

Conrad, L.C.A. and Pfaff, D.W. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J. Comp. Neurol.* 169, 185-200, (1976).

Consolazione, A., Bentivoglio, M., Soldstein, M. and Toffano, G. Evidence for crossed catecholaminergic nigrostriatal projections by combining wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase retrograde transport and tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. *Brain Res.* 338, 140-43, (1985).

Coyle, J.T. and Schwarcz, R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature.* 263, 244-46, (1976).

Creese, I. Burt, D. and Snyder, S.H. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion induced behavioral supersensitivity. *Science.* 197, 594-98, (1977).

Curtis, D.R., Duggan, A.W. and Johnston, G.A.K. The specificity of strychnine as a glycine antagonist in the mammalian spinal chord. *Exp. Brain Res.* 10, 447-62, (1970).

Cuttler, W.F.R., Hammerstad, F.J., Cornick, R.L. and Murray, E.J. Efflux of amino acid neurotransmitters from rat spinal chord slices. I Factors influencing the spontaneous efflux of 14 C - glycine and 3H GABA. *Brain Res.* 35, 337-55, (1971).

Dahlstrom, A. and Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol.Scand.* 62, Suppl 232,1-55, (1964).

Deniau, J.M., Hammond, C., Chevalier, G. and Feyer, J. Evidence for branched subthalamic nucleus projections to substantia nigra, entopeduncular nucleus and globus pallidus. *Neurosci. Lett.* 9,117-21, (1978).

Denner, L.A. and Wu, J.Y. Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate. *J. Neurochem.* 44,957-65, (1985).

Denny-Brown, D. The basal ganglia and their relation to disorders of movement. Oxford University Press (1962).

DiChiara, G., Morelli, M., Forceddu, M.L. and Gessa, G.L. Evidence

that nigral GABA mediates behavioral responses elicited by striatal dopamine receptor stimulation. *Life Sci.* 23, 2045-49, (1978).

DiChiara, G., Porceddu, M.L., Morelli, M., Mulac, M and Gessa, G.L. Evidence for a GABAergic projection from the substantia nigra to the ventromedial thalamus and the superior colliculus of the rat. *Brain Res.* 176, 273-274, (1979).

DiFiglia, M., Pasik, P. and Pasik, P. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* 114, 245-51, (1974).

Drummond, R.J. and Phillips, A.T. L-glutamic acid decarboxylase in non-neural tissues of the mouse. *J. Neurochem.* 23, 1207-1213, (1974).

Emson, P.C., Rehfeld, J.H.F., Langevin, H. and Rossor, M. Reduction in cholecystokinin-like immunoreactivity in the basal ganglia in Huntington's disease. *Brain Res.* 198, 496-500, (1980).

Enna, J.S., Kuhar, M.J., Creese, I. and Snyder, S. Alteration of brain neurotransmitter binding in Huntington's chorea. *Brain Res.* 116, 531-37, (1976).

Erdo, S.L. Peripheral GABAergic mechanisms. *Trends in Pharmacol. Sci.* 205-9, May, 1985.

Fahn, S. and Cote, J.L. Regional distribution of γ -aminobutyric acid (GABA) in the brain of the Rhesus monkey. *J. Neurochem.* 15, 209-13, (1968).

Farnebo, L.O. and Hamberg, B. Drug induced changes in the release of 3H-monoamines from field stimulated rat brain slices. *Acta Physiol. Scand.* 371, 35-42, (1971).

Faulk, M.L.R. and Mehler, R.W. The cells of origin of nigrotectal, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat. *Neurosci.* 3, 989-1002, (1976).

Feuerstein, C. Supersensitivity time causes of dopamine antagonist binding after nigrostriatal denervation. Evidence for early and drastic changes in the rat corpus striatum. *Brain Res.* 226, 221-34, (1981).

Fisher, S.R., Shiota, C., Levine, S.M., Hull, C.D. and Buhwald, N.A. Interhemispheric organization of corticocaudate projections in the cat: a retrograde double-labelling study. *Neurosci. Lett.* 48, 369-73, (1984).

Fonnum, F., Gottesfeld, Z. and Grofova, I. Origin and distribution of glutamate decarboxylase in substantia nigra of the cat. *Brain Res.* 71, 77-92, (1974).

Fonnum, F. A rapid radiochemical method for the determination of

choline acetyl transferase. *J. Neurochem.* 24, 407-9, (1975).

Fonnum, F., Storm-Mathisen, J. and Sivak, I. Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in corticostriate and corticothalamic fibres in rat brain. *Neurosci.* 6, 267-70, (1981).

Fox, C.A., Andrade, A.N., Echino, R.C. and Rafols, J.G. The primate globus pallidus: a Golgi and electron microscope study. *J. Hirnforsch.* 15, 75-93, (1978).

Freund, T.F., Powell, J.F. and Smith, A.D. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci.* 13, 1127-1213, (1984).

Gaitonde, K.M. Fate of utilization of glucose and compartmentalization of alpha-amino-glutarate and glutamate in rat brain. *Biochem. J.* 75, 307-10, (1965).

Gale, K., Hoog, J.S. and Guidotti, A. Presence of substance P in separate striatonigral neurons. *Brain Res.* 136, 277-80, (1977).

Gale, K. and Casa, M. Dynamic utilization of GABA in substantia nigra: Regulation by dopamine and GABA in the striatum and its clinical and behavioral implications. *Ann. New York Acad. Sci.* 380, 1-15, (1981).

Giachini, S., Capella, I. and Lindvall, O. Neuronal fibers in the GMP: Effects on dopaminergic and serotonergic regulation of striatal dopaminergic neurons. *Acta J. Pharmacol. Abstr.* 31, 1986-84, (1981).

Garcia-Muñoz, M., Nishida, M., Takahashi, J., Berger, A.G. and Arbuthnott, J.P. Functional integrity of reticulospinal striatonigral fibers. *Neurosci. Lett.* 147, 217-221, (1977).

Garcia-Muñoz, M., Calzavara, P., Aguilar, A. and Arbuthnott, J.P. Participation of projections from substantia nigra reticulata to the lower brain stem in learning behaviour. *Exp. Neurol.* 78, 380-89, (1982).

Garcia-Muñoz, M., Calzavara, P., Wright, A.K. and Arbuthnott, J.P. The anatomical substrate of the turning behaviour seen after lesion in the nigrostriatal dopamine system. *Neurosci.* 9, 87-95, (1983).

Gauchey, C., Beaujoan, J.C., Besson, M.J., Kerdelhue, B., Glowinsky, J. and Michelot, R. Topographical distribution of substance P in the cat substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 12, 127-34, (1979).

Giorguieff, M.F., Le Floch, M.L., Glowinsky, J. and Besson, M.J. Involvement of cholinergic presynaptic receptors of nicotinic and muscarinic types in the control of spontaneous release of dopamine from striatal dopaminergic terminals in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 200, 535-44, (1977a).

Giorguieff, M.F., Kemel, M.L. and Glowinsky, J. Presynaptic effect of L-glutamic acid on the release of dopamine in rat striatal slices. *Neurosci. Lett.* 6, 75-78, (1977b).

Giorguieff, M.F., Kemel, M.L., Glowinsky, J. and Besson, M.J. Stimulation of dopamine release by GABA in rat striatal slices. *Brain Res.* 139, 115-20, (1979).

Giorguieff-Chesselet, M.F., Kemel, M.L., Wandscheer, D. and Glowinsky, J. Attempts to localize the GABA-receptors involved release of newly synthesized 3H-dopamine in rat striatal slices. *Brain Res.* 175, 383-86, (1979a).

Giorguieff-Chesselet, M.F., Kemel, M.L., Wandscheer, D. and Glowinsky, J. Glycine stimulates the spontaneous release of newly synthesized 3H-dopamine in rat striatal slices. *Eur. J. Pharmacol.* 60, 101-4, (1979b).

Gold, B.I. and Roth, R.H. Glutamate decarboxylase activity in striatal slices: characterization of the increase following depolarization. *J. Neurochem.* 32, 883-889, (1979).

Graybiel, A.M. The thalamo-cortical projection of the so-called posterior nuclear group: a study with anterograde degeneration methods in the cat. *Brain Res.* 49, 229-44, (1973).

Graybiel, A.M. and Ragsdale, W.C. Fiber connections of the basal ganglia. *Prog. Brain Res.* 51, 237-283, (1979).

Grove, J., Gardener, C.R. and Richards, M.H. Measurement of release of endogenous GABA and catabolites of 3H GABA from synaptosomal preparations using ion-exchange chromatography. *Neurochem. Res.* 7, 589-99, (1982).

Gulley, R.L. and Wood, R.L. The fine structure of the neurons in the rat substantia nigra. *Tissue Cell.* 3, 675-81, (1971).

Gunne, L.M., Haggstrom, J.E. and Sjoquist, B. Association with persistent neuroleptic induced dyskinesia of regional changes in brain GABA synthesis. *Nature.* 309, 347-49, (1984).

Haber, B., Kuriyama, K. and Roberts, E. L-glutamic acid decarboxylase: A new type in glial cells and human brain gliomas. *Science.* 168, 598-99, (1970).

Haber, S. and Elde, R. Correlation between met-enkephalin and substance P immunoreactivity in the primate globus pallidus. *Neurosci.* 6, 1291-97, (1981).

Hattori, T., Fibiger, C.H. and McGeer, P.L. Demonstration of pallidonigral projection innervating dopaminergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 162, 487-504, (1975).

Hattori, T., Singh, V.K., McGeer, E.G. and McGeer, P.L.

Immunohistochemical localization of choline acetyl transferase containing neostriatal neurons and their relationship with dopaminergic synapses. *Brain Res.* 102, 164-73, (1976).

Hayden, R.M. Reflections on the history of Huntington's chorea. *Trends in Neurosci.* 4, 122-24, (1983).

Hill, D.R. and Bowery, N.G. 3H-GABA bind to bicuculine insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature.* 290, 149-52, (1981).

Hokfelt, T. and Ljungdahl, L. Autoradiographic identification of cerebellar and cerebral cortical neurons accumulating labelled gamma-aminobutyric acid (3H-GABA). *Exp. Brain Res.* 14, 354-62, (1972).

Hornykiewicz D., Lloyd, G.K. and Davidson. The GABA system. Function of the basal ganglia and Parkinson's disease. In: GABA in nervous system function. Roberts, E., Chase, T.N. and Tower, D.B. (Eds). Raven Press (1976).

Imperato, S. and DiChiara, G. Trans-striatal dialysis coupled to reversed phase high performance liquid chromatography with electro-chemical detection: A new method for the study of the "in vivo" release of endogenous dopamine and its metabolites. *J. Neurosci.* 4, 966-77, (1984).

Itoh, M., Uchimura, H., Hirano, M., Saito, M. and Nakahara, T. Effects of reserpine and pargyline on glutamate decarboxylase activity in rat hypothalamic nuclei. *Brain Res.* 115, 527-34, (1976).

Iversen, L.L. Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.* 41, 571-91, (1971).

Iversen, L.L. and Bloom, E.F. Studies on the uptake of 3H-GABA and 3H-glycine in slices and homogenates of rat brain and spinal chord by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.* 41, 131-43, (1972).

Jacobson, I. and Hamberger, A. Veratridine-induced release "in vivo" and "in vitro" of amino acids in the rabbit olfactory bulb. *Brain Res.* 299, 103-12, (1984).

Jessel, T.M., Emson, P.C., Paxinos, G. and Cuervo, C. Topographical projections of substance P and GABA pathways in the striata and pallido-nigral systems. A biochemical and immunohistochemical study. *Brain Res.* 152, 487-99, (1978).

Kaczmarek, L.K. and Adley, W.R. Weak electric gradients change ionic and transmitter fluxes in cortex. *Brain Res.* 66, 537-40, (1976).

Kalil, K. Patch like termination of thalamic fibers in the putamen of the Rhesus monkey: an autoradiographic study. *Brain*

3. 140, 333-39, (1978).

to, G., Carson, S., Kancz, M.L., Glowinsky, J. and Giorgiueff, F. Changes in striatal specific 3H-atropine binding after bilateral 6-OHDA lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci.* 22, 1607-14, (1978).

Miller, R., Oke, A., Mefford, I. and Adams, R.N. Liquid chromatographic analysis of catecholamines: routine assay for regional brain mapping. *Life Sci.* 19, 995-1004, (1976).

Kemel, M.L., Gauchy, C., Glowinski, J. and Besson, M.J. Spontaneous and potassium-evoked release of 3H-GABA newly synthesized from 3H-glutamine in slices of the rat substantia nigra. *Life Sci.* 24, 2137-2150, (1978).

Kemel, M.L., Gauchy, C., Romo, R., Glowinski, J. and Besson, M.J. "in vivo" release of (3H) GABA in rat caudate nucleus and substantia nigra. I. Bilateral changes induced by a unilateral nigral application of muscimol. *Brain Res.* 272, 331-40, (1983).

Kemel, M.L., Cheramy, A. and Glowinsky, J. "In vivo" release of (3H) GABA in rat caudate nucleus and substantia nigra. *Brain Res.* 303, 203-13, (1984).

Kemp, J.N. and Powell, T.P.S. The cortico-striate projection in the monkey. *Brain Res.* 93, 525-46, (1974).

Killian, K.F., Dasgupta, S.R. and Killian, E.K. Studies on the action of convulsant hydrazides as vitamin B-6 antagonists in the central nervous system. In: Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Roberts, E., Baxter, C.F., van Haneveld, A., Wiersma, C.A.G, Adey, W.R. and Killian, K.F. (Eds). Pergamon (1960).

Kilpatrick, C.I., Starr, M.S., James, T.A. and MacLeod, N.K. Evidence for the involvement of nigrothalamic neurons in circling behaviour in the rat. In: GABA and the basal ganglia. DiChiara, G. and Gessa, G.L. (Eds). *Adv. Biochem. Pharmacol.* Raven Press (1981).

Kim, R., Nakano, K., Jarayanan, A. and Carpenter, M.B. Projections of the globus pallidus and adjacent structures. An autoradiographic study in the monkey. *J. Comp. Neurol.* 189, 263-90, (1976).

Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, F. and McGeer, E.G. Choline acetyltransferase containing-neurons in rodent brain demonstrated by immunocytochemistry. *Sci.* 208, 1057-59, (1980).

Kitai, T.S. Electrophysiology of the corpus striatum and brainstem integrating systems. In: *Handbook of Physiology*. American Physiological Society. (1981).

Kopp, N., Jordan, D., Michel, J.P., Pialat, J., Veisserie, M.,

Chazot, G. and Tommasi, M. Etude topographique et chimique de l'enzyme de synthese du GABA dans les syndromes parkinsoniens. *Ann. Pathol.* 7, 327-31, (1983).

Korf, J., van der Hayden, A.M., Verema, K and Postema, F.. Distribution and release of GABA in the basal ganglia. In: GABA and the basal ganglia. DiChiara, G. and Bessa, G.L. (Eds). *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* Raven Press (1981).

Kraus, P. Hoppe Seylers. *Z. Physiol. Chem.* 349, 1425-27, (1968).

Langnickel, R. Bluth, R. and Dalscher, W. Various dose-dependent influences of apomorphine on the acetylcholine turnover in striatum and mesolimbic areas of the brain. *Biomed. Biochem. Acta.* 42, 937-46, (1983).

Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W. and Irwin, I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine synthesis. *Science.* 219, 979-80, (1983).

Lanoir, J. Soghomonian, J.F. and Cadenot, G. Radioautographic study of 3H-GABA uptake in the oculomotor nucleus of the cat. *Exp. Brain Res.* 48, 137-43, (1982).

Leviel, V., Cherámy, A. and Glowinsky, J. Role of the dendritic release of dopamine in the reciprocal control of the two nigrostriatal dopaminergic pathways. *Nature.* 280, 236-39, (1979).

Lewin, R. Trail of ironies to Parkinson's disease. *Science.* 224, 1083-85, (1984).

Lindgren, S. Anden, E.N. and Grabowska-Anden, M. A fluorometric method for determination of GABA in tissues following cation exchange chromatography and condensation with o-phthaldehyde. *J. Neural. Transs.* 55, 243-52, (1982).

Lindroth, P. and Mopper, K. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldehyde. *Anal. Chem.* 51, 1667-74, (1979).

Lowry, O.H., Rosebrough, A.L. Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-75, (1951).

Lubetzky, C., Chesselet, M.F. and Glowinsky, J. Modulation of dopamine release in rat striatal slices by delta opiate agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222, 435-40, (1982).

Mao, C.C., Cheney, E., Marco, E., Revuelta, A. and Costa, E. Turnover times of gamma-aminobutyric acid and acetylcholine in nucleus caudatus, nucleus accumbens, globus pallidus and substantia nigra: effects of repeated administration of haloperidol. *Brain Res.* 132, 375-79, (1977).

Marco, E., Mao, C.C., Revuelta, A., Peralta, E. and Costa, E. Turnover rates of gamma-aminobutyric acid in substantia nigra, nucleus caudatus, globus pallidus and nucleus accumbens on rats injected with cataleptogenic and non cataleptogenic antipsychotics. *Neuropharmacol.* 17, 529-56, (1978).

Marsden, C. The enigma of the basal ganglia and movement. *Trends in Neurosci.* 3, 284-87, (1980).

Marshall, J.F. and Ungerstedt, U. Striatal efferent fibres play a role in maintaining rotational behavior in the rat. *Science*. 198, 62-64, (1977).

Martin, D.L. and Smith, A.A. Ions and the transport of gamma-aminobutyric acid by synaptosomes. *J. Neurochem.* 19, 841-55, (1972).

Martin, D.L. and Miller, L.P. Comment on the evidence for GAD II. In: GABA in nervous system function. Roberts, E., Chase, T.N. and Tower, D.B. (Eds). Raven Press (1974).

McGeer, G.E., Staines, A.W. and McGeer, L.P. Neurotransmitters in the basal ganglia. *Can. J. Neurol. Sci.* 11, 89-99, (1984).

Melis, M.R. and Gale, K. Intranigral application of substance P antagonists prevents the haloperidol-induced activation of striatal tyrosine hydroxylase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 326, 83-86, (1984).

Miller, L.P. and Walters, J.R. Effects of depolarization on cofactor regulation of glutamic acid decarboxylase in substantia nigra. *J. Neurochem.* 33, 533-39, (1979).

Minard, F.N. Relationships among pyridoxal phosphate, vitamin B-6 deficiency and convulsions induced by 1,1 dimethylhydrazine. *J. Neurochem.* 14, 681-92, (1967).

Mitchell, I. and Redgrave, P. Effects of partial, unilateral, nigrostriatal lesions and histofluorescence and behavioural indices of dopamine transmission. *Procc. British Pharmacol. Soc.* April (1980).

Nauta, J.H.W. and Mehler, R.W. Projections of the lentiform nucleus in the monkey. *Brain Res.* 1, 3-42, (1966).

Nauta, J.H.W. Projections of the pallidal complex: An autoradiographic study in the cat. *Neurosci.* 4, 1875-81, (1979).

Neal, E.A., Ortel, W.H., Bowers, L.M. and Weise, V.K. Glutamate decarboxylase immunoreactivity and 3H-aminobutyric acid accumulation within the same neurons in dissociated cell cultures of cerebellar cortex. *J. Neurosci.* 3, 376-82, (1983).

Nieoullon, A., Cheramy, A. and Glowinsky, J. Interdependence of the nigrostriatal dopaminergic systems on the two sides of the

brain. Science, 193, 416-18, (1977).

Nieouillon, A., Cheramy, A. and Glowinski, J. Release of dopamine evoked by electrical stimulation of the motor and visual areas of the cerebral cortex in both caudate nuclei and in the substantia nigra of the cat. Brain Res. 145, 69-83, (1978).

Nieouillon, A. and Dasticier, N. Increased glutamate decarboxylase activity in the red nucleus of the adult cat after cerebellar lesions. Brain Res. 224, 129-39, (1981).

Nieouillon, A. and Dasticier, N. Changes in choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase, high affinity glutamate uptake and dopaminergic activity induced by kainic acid lesions of the thalamo-striatal neurons. Neurosci. Lett. 52, 299-304, (1985).

Obata, K. and Takeda, K. Release of γ -aminobutyric acid into the fourth ventricle induced by stimulation of the cat's cerebellum. J. Neurochem. 16, 1043-47, (1969).

Okada, Y. and Hassler, R. Uptake and release of GABA in slices of substantia nigra of the rat. Brain Res. 49, 214-17, (1973).

Okada, Y. Role of GABA in the substantia nigra. In: GABA in the nervous system function. Roberts, E. Chase, T.N. and Tower, D.B. (Eds). Raven Press (1976).

Ottersen, D.P. and Storm-Mathisen, J. Glutamate and GABA containing neurons in the mouse rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. J. Comp. Neurol. 229, 374-92, (1984).

Patiño, P. and García-Muñoz, M. Electrophysiological thalamic responses evoked by dopamine receptor stimulation into the striatum. Brain Res. 361, 1-9, (1985).

Paxinos, G. and Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press (1982).

Pérez de la Mora, M. and Fuxe, K. GABA, dopamine and acetylcholine interactions. Studies with oxotremorine. Brain Res. 135, 107-22, (1977a).

Pérez de la Mora, M., Fuxe, K., Hokfelt, T. and Jungdahl, A. Evidence for a nerve impulse-dependent GABA accumulation in the substantia nigra after treatment with α -glutamylhydrazide. Neurosci. Lett. 5, 75-82, (1977b).

Perry, T.L., Hansen, S. and Kloster, M. γ -Aminobutyric acid in brain. N. Engl. J. Med. 288, 337-42, (1973).

Perry, L.P., Javoyd-Ågid, F., Ågid, Y. and Fibiger, H.C. Striatal GABAergic neuronal activity is not reduced in Parkinson's disease. J. Neurochem. 40, 1120-23, (1983).

Porter, T.G. and Martin, D.L. Evidence for feedback regulation of glutamate decarboxylase by gamma aminobutyric acid. *J. Neurochem.* 43, 1464-67, (1984).

Potashner, J.S. Effects of tetrodotoxin, calcium and magnesium on the release of amino acids from slices of guinea-pig cerebral cortex. *J. Neurochem.* 31, 187-95, (1978).

Pritzel, M., Sarter, M., Morgan, S. and Huston, J.P. Interhemispheric nigrostriatal projections in the rat: bifurcating nigral projections and loci of crossing in the diencephalon. *Brain Res. Bull.* 10, 385-90, (1983a).

Pritzel, M., Huston, J.P. and Sarter, M. Behavioral and neuronal reorganization after unilateral substantia nigra lesions: evidence for increased interhemispheric projections. *Neurosci.* 9, 879-888, (1983b).

Reisine, T.D., Nagy, J.L., Beaumont, K., Fibiger, H.C. and Yamamura, H. The localization of receptor binding sites in the substantia nigra and striatum of the rat. *Brain Res.* 177, 241-52, (1979).

Reisine, T.D., Chesselet, F., Lubetsky, C., Cheramy, A. and Glowinsky, J. A role for striatal beta-adrenergic receptors in the regulation of dopamine release. *Brain Res.* 241, 123-30, (1982).

Reubi, J.C. and Emson, P. Release and distribution of endogenous 5-HT in rat substantia nigra. *Brain Res.* 139, (1978).

Ribak, C.E., Vaughn, J.E. and Roberts, E. The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* 187, 1261-76, (1979).

Rinvik, E. and Brofoss, I. Observations on the fine structure of the substantia nigra in the cat. *Exp. Brain Res.* 11, 259-69, (1970).

Roberts, E., Younger, F. and Frankel, S. *J. Biol. Chem.* 191, 277-88, (1951).

Roberts, E. Free aminoacids of nervous tissue: Some aspects of metabolism of gamma-aminobutyric acid. In: Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Roberts, E., Baxter, C.F., van Haneveld, A., Wiersma, C.A.G., Adey, W.R. and Killian, K.F. (Eds). Pergamon (1960).

Royce, G.J. Autoradiographic evidence for a discontinuous projection to the caudate nucleus from the contralateral nucleus in the cat. *Brain Res.* 146, 145-50, (1978).

Sandberg and Lindstrom. Amino acids in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat-collection "in vivo". *J. Neurosci.*

Meth. 9, 65-74, (1983).

Scheel-Kruger, J., Magelund, G. and Olanas, M.C. The role of GABA in the basal ganglia and limbic system for behaviour. In: Aminoacidic neurotransmitters. DeFeudis, F. and Mandel, P. (Eds). Raven Press (1981a).

Scheel-Kruger, J., Magelund, G. and Olanas, M.C. Role of GABA in the striatal output system: Globus pallidus, nucleus entopeduncularis, substantia nigra and nucleus subthalamicus. Adv. Biochem. Psychopharmacol. Vol 30. Raven Press (1981b).

Scheel-Kruger, J. GABA: An essential moderator and mediator in the basal ganglia system of dopamine related functions. Acta Neurol. Scand. 65 Suppl 90, 40-45, (1982).

Schultz, W. and Ungerstedt, U. Short-term increase and long term reversion of striatal cell activity after degeneration of the nigrostriatal dopamine system. Exp. Brain Res. 33, 159-71, (1978).

Seab, J.A. Anatomy and pathology of the extrapyramidal diseases. Brain Res. Bull. 11, 135-41, (1983).

Segovia, J., Tossman, U., Herrera-Marschitz, M, Garcia-Munoz, M and Ungerstedt, U. - Aminobutyric acid release in the globus pallidus in vivo after a 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra of the rat. Neurosci. Lett. 70, 364-66, (1986).

Seiler, N., Al-Therib, M.J. and Katoaka, K. Formation of GABA from putrescine in the brain of fish (*Salmo irideus gibb*). J. Neurochem. 20, 699-708, (1973).

Sellstrom, A. and Hamberger, A. Neuronal and glial systems for - aminobutyric acid transport. J. Neurochem. 24, 247-52, (1975).

Shank, P.R. and Campbell, G. Metabolic precursors of glutamate and GABA. In: Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system. Hertz, L., Kvamme, E., McGeer, E.G. and Schousbae, A. (Eds). Neurology and Neurobiology Vol 7. Alan R. Liss (1983).

Siegel, G.J., Albers, W.R., Agranoff, B.W. and Katzman, R. Basic Neurochemistry. Little Brown Co. (1981).

Sperk, G. and Singer, A.F. "In vivo" synthesis of substance P in the corpus striatum of the rat brain and its transport to the substantia nigra. Brain Res. 238, 127-35, (1982).

Spokes, E.G.S. The neurochemistry of Huntington's chorea. TINS. 4, 111-18, (1981).

Stachowiak, M.K., Bruno, J.P., Snyder, A.M., Stricker, E.M. and Zigmond, M.J. Apparent sprouting of striatal serotonergic terminals after dopamine-depleting brain lesions in neonatal

rats. Brain Res. 291, 165-67, (1984).

Staines, A.W., Nagy, J.I., Vincent, S.R. and Fibiger, H.C. Neurotransmitters contained in the efferents of the striatum. Brain Res. 194, 391-402, (1980).

Starr, S.M. and Kilpatrick, C.I. Distribution of γ -aminobutyrate following lesions or electrical stimulation of the substantia nigra. Neurosci. 6, 1095-104, (1981).

Stoof, J.C., DenBreejen, E.J.S. and Mulder, A.H. GABA modulates the release of dopamine and acetylcholine from rat caudate nucleus slices. Eur. J. Pharmacol. 57, 35-40, (1979).

Storm-Mathisen, J. High affinity uptake of GABA in presumed GABAergic nerve endings in the rat brain. Brain Res. 84, 409-27, (1975).

Study, R.E. and Barker, J. Diazepam and (-) pentobarbital fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 718-24, (1981).

Sugahara, M., Asakura, T., Kurioka, S. and Matsuda, M. 4-Aminobutyraldehyde as a substance convertible "in vivo" to GABA. J. Neurochem. 40, 694-96, (1983).

Swanson, L.W. and Cowan, W.M. A note on the connections and development of the nucleus accumbens. Brain Res. 92, 324-30, (1975).

Sze, Y.P., Kuriyama, K., Haber, B. and Roberts, E. Effects of GABA on L-glutamic acid decarboxylase activities in chick embryo brain. Brain Res. 26, 121-30, (1971).

Sze, Y.P. L-glutamate decarboxylase. In: GABA biochemistry and central nervous system function. Mandel, P. and DeFeudis, F. (Eds). Plenum Press (1978).

Tapia, R., Sandoval, M.E. and Contreras, P. Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral activity. J. Neurochem. 24, 1283-85, (1975).

Tapia, R. γ -Aminobutyric acid. Metabolism and biochemistry of synaptic transmission. In: Handbook of Neurochemistry (Vol 3). Lajtha, A. (Ed). Plenum Press (1983).

Tappaz, L.M., Brownstein, J.M. and Palkovits, M. Distribution of glutamate decarboxylase in discrete brain nuclei. Brain Res. 108, 371-79, (1976).

Thoenen, H., Muller, R.A. and Axelrod, J. Increased tyrosine-hydroxylase activity after induced alteration of sympathetic transmission. Nature. 221, 1264-65, (1969).

Thoenen, H. Trans-synaptic enzyme induction. *Life Sci.* 14, 223-35, (1974).

Tossmann, U., Eriksson, E., Delin, A., Hangelfelt, L., Law, D. and Ungerstedt, U. Brain aminoacids measured by intracerebral dialysis in portacaval shunted rats. *J. Neurochem.* 41, 1046-51, (1983).

Tossmann, U. and Ungerstedt, U. The effect of apomorphine and pergolide on potassium-evoked release of putative aminoacid neurotransmitters studied "in vivo" with intracerebral dialysis. *Acta Physiol. Scand.* 124 Suppl 542, 219, (1985).

Tossmann, U. and Ungerstedt, U. Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* en prensa, (1986).

Tulloch, I.F., Arbuthnott, W.G., Wright, M., Garcia-Nuñez, M. and Nicolau, M.N. The striatonigral fibres and the feedback control of dopamine metabolism. *Psychological. Med.* 8, 471-82, (1978).

Ungerstedt, U., Butcher, L.L., Andén, N.E. and Fuxe, K. Direct chemical stimulation of dopaminergic mechanisms in the neostriatum of the rat. *Brain Res.* 14, 461-71, (1969).

Ungerstedt, U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 92 Suppl 367, 1-48, (1971a).

Ungerstedt, U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behavior. *Acta Physiol. Scand.* 92 Suppl 367, 49-68, (1971b).

Ungerstedt, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* 92 Suppl 367, 69-83, (1971c).

Ungerstedt, U. and Herrera-Marschitz, M. Behavioral pharmacology of dopamine receptor mechanism. In *Chemical neurotransmission: 75 years*. Stjarne, L., Hedquist, P. and Wennmalm, W. (Eds). Academic Press (1981).

Ungerstedt, U. Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. In: *Measurement of neurotransmitter release "in vivo"*. Marsden, A.C. (Ed). John Wiley & Sons (1984).

Van der Heyden, J.A.W., Verema, K. and Korff, J. "In vivo" release of endogenous γ -aminobutyric acid from rat striatum: Effects of muscimol, oxotremorine and morphine. *J. Neurochem.* 34, 1648-53, (1980).

Vargas, O., Doria de Lorenzo, M.C., Saldade, M.C. and Orrego, F. Potassium-induced release of (3H)-GABA and of (3H) noradrenaline from normal and reserpinized rat brain cortex slices. Differences in calcium-dependency and in sensitivity to potassium ions. *J.*

Neurochem. 28, 165-70, (1977).

Vincent, P.S., Nagy, I.J. and Fibiger, C.H. Increased striatal glutamate decarboxylase after lesions of the nigro-striatal pathway. Brain Res. 143, 168-73, (1978).

Vincent, S., Hockfelt, T., Christensson, I. and Terenius, L. Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striato-nigral pathway. Eur. J. Pharmacol. 85, 251-52, (1982).

Yamamoto, K.B., Lane, F.R. and Freed, R.C. Normal rats trained to circle show asymmetric caudate dopamine release. Life Sci. 30, 2155-62, (1982).

Yamamoto, T., Nanjoh, C. and Karuma, I. Determination of endogenous GABA release from the cerebral cortex slices of the rat by high-performance liquid chromatography with series-dual electrochemical detector. Neurochem. Int. 7, 77-82, (1985).

Yoshida, M. et al. Topographical distribution of γ -aminobutyric acid within the cat thalamus: in relation to basal ganglia as determined by mass fragmentography. J. Neurochem. 37, 670-76, (1981).

Wheeler, D.A. A comparison of sodium dependent GABA transport in cortical synaptosomes from Long-Evans and Sprague-Dawley rats. J. Neural. Trans. 55, 255-68, (1982).

Wilson, S.H., Schirer, B.K., Farber, J.L., Thompson, E.J., Rosenberg, R.N., Blume, A.J. and Nirenberg, M.W. Markers for gene expression in cultured cells from the nervous system. J. Biol. Chem. 247, 3159-3169, (1972).

Wooten, G.F. and Collins, R.C. Effects of dopaminergic stimulation of functional brain metabolism in rats with unilateral substantia nigra lesions. Brain Res. 263, 267-75, (1983).

Wu, J.Y. Purification, characterization and kinetic studies of GAD and GABA-T from mouse brain. In: GABA in nervous system function. Roberts, E. Chase, T.N. and Tower, D.B. (Eds). Raven Press (1976).

Zainos, A., Chávez, L., DeAnda, R. and García-Muñoz, M. Turning behavior, barrel rolling and sensory neglect induced by picrotoxin in the thalamus. Exp. Neurol. 93, 534-47, (1984).

Zetterstrom, T., Sharp, T. and Ungerstedt, U. Effect of neuroleptic drugs on striatal dopamine release and metabolism in the awake rat studied by intracerebral dialysis. Eur. J. Pharmacol. 106, 27-37, (1985).

Zetterstrom, T. and Ungerstedt, U. Effects of apomorphine on the "in vivo" release of dopamine and its metabolites, studied by brain dialysis. Eur. J. Pharmacol. 97, 29-36, (1984).

Zetterstrom, T., Herrera-Marachi, M. and Ungerstedt, U.
Simultaneous measurement of dopamine release and rotational
behaviour in 6-OHDA denervated rats using intracerebral dialysis.
Brain Res. en prensa, (1986).

AFENDICE

CHANGES IN THE ACTIVITY OF GAD IN THE BASAL GANGLIA OF THE RAT
AFTER STRIATAL DOPAMINERGIC DENERVATION

J. Segovia and M. Garcia-Munoz*
Institute of Cellular Physiology, U.N.A.M.,
P.O. Box 70-600, 04510 Mexico, D.F., 35.9

* To whom correspondence should be addressed.

Key words: GABA, GAD, Striatum, Substantia Nigra, Globus
Pallidus, Basal Ganglia

Running title: GAD changes in the striatum.

SUMMARY

The functional effects of dopamine have been related to the descending efferent GABAergic pathway from the striatum. In the present study we have examined the effect of a unilateral lesion of the dopamine-containing nigro-striatal pathway, on the activity of the glutamic acid decarboxylase (GAD) at two survival times: 4 and 8 weeks. The structures studied were the striatum and its output target areas, globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra. Four weeks after the lesion, the activity of GAD was increased on the ipsilateral striatum, globus pallidus and substantia nigra. This effect was reversed at 8 weeks, when a decrease in enzyme activity was observed in the three structures. These time related changes in enzyme activity reveal the presence of a physiological compensatory process.

There is evidence for a GABAergic output from the striatum which innervates the globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra (McGeer, Fibiger, Hattori, Sing, McGeer and Maler, 1974; Hattori, Fibiger and McGeer, 1975; Nagy, Carter and Fibiger, 1978). The unilateral electrical stimulation or the direct administration of acetylcholine or bicuculine into the striatum leads to enhanced GABA release in the ipsilateral substantia nigra (Besson, Kemel, Gauchy and Glowinski, 1982; Kemel, Gauchy, Romo, Glowinsky and Besson, 1983), this suggests that increased activity in the striato-nigral pathway leads to increased release of GABA in the substantia nigra. On the other hand, the dopamine containing pathway from substantia nigra to striatum seems to exert an important influence upon striatal cells. The most striking aspect of Parkinson's disease is the decrease in the dopamine levels in the striatum as a consequence of degeneration of the nigro-striatal pathway (Hornikiewicz, Lloyd and Davidson, 1976). A consistent decrease in the activity of glutamic acid decarboxylase (GAD), the enzyme responsible for GABA synthesis, has been reported in the striatal tissue in post-mortem studies (McGeer, McGeer, Wada and Jung, 1971; Hornikiewicz et al, 1976; McGeer and McGeer, 1976) suggesting an interaction between the dopamine-containing terminals and the GABAergic cells in the striatum. Since the functional effects of dopamine have been related to the descending efferent GABAergic pathway from striatum (Garcia-Munoz, Nicolaou, Tulloch, Wright and Arbuthnott, 1977; Scheel-Kruger, 1982; Garcia-Munoz, Patino,

Wright and Arbuthnott, 1983), in the present study we have examined the effect of the destruction of the nigro-striatal pathway in the activity of GAD not only in the striatum but in the globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra. Bilateral asymmetric changes in the release of GABA have been reported in substantia nigra and striatum (Besson et al, 1982; Kemel et al, 1983) therefore it seemed of primary interest to investigate GAD activity on both sides of the brain. The activity of GAD was measured at two different times after the nigro-striatal lesion in order to detect longer-term compensatory changes after the lesion.

METHODS

SUBJECTS

Seventy-nine male Wistar albino rats weighing 220-250 g at the start of the experiment were housed four to a cage with normal room illumination. Food and water were continuously available.

STEREOTAXIC SURGERY AND BEHAVIORAL TESTING

Stereotaxic injections of 6-hydroxydopamine (6-OHDA; Bug in 4ul sterile saline containing 0.5mg/ml ascorbic acid) were performed under Equithesin anesthesia as previously described (Garcia-Munoz et al, 1983). The animals were allowed to recover for one week, then the effectiveness of the lesion was tested by measuring turning behaviour in response to apomorphine (0.25 mg/kg, i.p.). Animals turning more than 150 times/30 min were

selected for this study. This behaviour has been reported to correlate with a significant decrease in dopamine transmission (Creese, Burt and Snyder, 1977) nevertheless the amount of dopamine was determined in 6 turning animals 4 weeks after the lesion. The postoperative survival time was 4 weeks for a group of 32 turning animals and 8 weeks for a group of 19 rats, 28 animals were used as untreated controls.

TISSUE DISSECTION

For biochemical determinations, the rats were killed by cervical dislocation and the brain quickly dissected over dry-ice. The brain was cut at the level of the optic chiasma (A6280 μm according to the atlas of König and Klippel, 1963) and the striatum and globus pallidus dissected out. A holder with two slits 1mm apart was used to cut slices of tissue. According to the atlas at the level of A5150 μm , the entopeduncular nucleus was punched out with a hollow needle of 1mm inner diameter. The substantia nigra was cut from another slice taken at the level of A2420 μm . The same area from 3 animals was pooled to achieve minimal variance of the mean results except for the striatum in which case there was enough tissue to use one structure per assay.

BIOCHEMICAL DETERMINATIONS

GAD activity was assayed by a modification (Perez de la Mora, Fuxe, Hokfelt and Ljungdahl, 1977) of the procedure described by Albers and Brady (1959). The tissue was homogenized in 50 mM phosphate buffer pH 6.4, containing Triton X-100 (0.5 %

v/v), pyridoxal phosphate $10^{-5}M$ and AET $10^{-4}M$. The tissue homogenates were incubated at $37^{\circ}C$ for 40 min in the buffer containing $2.5 \times 10^{-2}M$ glutamic acid and $0.94 \mu Ci/ml$ of $(1-^{14}C)DL$ glutamic acid (New England Nuclear), $pH=7.0$. The activity of GAD was estimated in triplicate and sample to blank ratios were never lower than 5:1. Brain structures were either frozen and stored in liquid nitrogen until assay or were immediately assayed, no differences in GAD activity were found following either procedure. The proteins were determined according to the method of Lowry, Rosenbrough, Farr and Randal (1951).

Choline acetyl transferase was measured as previously described by Fonnum (1975). Dopamine concentration was determined by high pressure liquid chromatography with electrochemical detection (Bioanalytical Systems; Keller, Oke, Mefford and Adams, 1976).

STATISTICAL ANALISIS

To compare the results a Student's t-test was used (Bernstein, 1964). The statistical analysis was performed comparing the results against the data obtained in the control untreated rats.

RESULTS

The activity of GAD in control unlesioned rats was similar when structures in opposite hemispheres were compared. The total mean ratio between hemispheres was 1.02 ± 0.1 . Within structures the ratio between hemispheres ranged from 0.93 to 1.12. Four weeks after a unilateral 6-OHDA lesion the enzyme activity significantly increased on the ipsilateral side in the striatum, globus pallidus and substantia nigra (40, 41 and 38% respectively). On the contralateral side the entopeduncular nucleus showed a significant decrease (38%) (Fig. 1). By eight weeks the enzyme activity returned to control levels in the striatum and in the globus pallidus and reversed in the substantia nigra showing a significant decrease. On the contralateral side, at 8 weeks only the globus pallidus showed a significant decrease (Table 1).

The concentration of dopamine was measured in 6 rats that turned 180 ± 23 times/30 min one week after the lesion and had a survival time of 4 weeks. The amount of dopamine on the intact side was 12.0 ± 3.1 ng/g wet tissue whereas on the lesioned side it was 0.3 ± 0.1 ng/g wet tissue indicating a decrease of 98%. To test the specificity of the loss of GAD in striatum, CAT activity was estimated in 6 rats at 4 weeks postoperatively. The activity of CAT was 369.3 ± 121 ($X \pm SD$) mg/g wet tissue/ 15 min for the intact side and 429 ± 121 for the lesioned side, indicating a non-significant increase of 14% on the lesioned side.

DISCUSSION

The results described here show that the activity of GAD in the striatum, globus pallidus and substantia nigra ipsilateral to a 6-OHDA lesion depends on the time of survival after the lesion. With a survival time of 4 weeks there is an increase in the activity of GAD in these structures which is in agreement with previous reports involving similar lesions (Vincent, Nagy and Fibiger, 1978; Gale and Casu, 1981) or chronic dopamine receptor blockade (Mao, Cheney Marco, Revuelta and Costa, 1977; Marco, Mao, Revuelta, Peralta and Costa, 1978). Therefore it could be suggested that GABAergic cells in the striatum are more active after the tonic inhibitory action of dopamine has been eliminated.

The reversal of the effect seen in the striatum and globus pallidus at 8 weeks after the lesion is in agreement with previous experiments; it has been reported that removal of dopaminergic input results in increased spontaneous electrical activity of striatal neurones only during an initial phase and that the firing rate returns to basal levels later on (Arbuthnott, 1974; Shultz and Ungerstedt, 1978). Also spontaneous postural asymmetries due to a 6-OHDA or kainic acid lesion of substantia nigra cease a few days after the operation (DiChiara, Porceddu, Morelli, Mulas and Gessa, 1979; Garcia-Munoz et al, 1983). These results indicate that some kind of compensation or adaptative process has occurred. Recently it has been reported that a substantia nigra lesion can unmask connections from the contralateral striatum by terminal sprouting of crossed projections (Pritzel, Sarter, Morgan and Huston, 1983; Pritzel,

Huston and Sarter, 1983). A compensatory mechanism of this kind could be proposed to occur between 4 and 8 weeks after the 6-OHDA lesion in the striatum and globus pallidus.

The marked decrease of enzyme activity seen in the substantia nigra at 8 weeks could be the consequence of the changes observed in the striatum and the globus pallidus. It has been proposed that projections from globus pallidus to striatum and substantia nigra arise from divergent axon collaterals (Staines and Fibiger, 1984), these neurones could also play a role in the compensatory changes observed in substantia nigra and striatum.

In the basal ganglia, changes in neurotransmission on structures of one side of the brain seem to affect the structures of the other hemisphere. For instance in the substantia nigra, electrical stimulation of the striatum leads to symmetrical increases in GABA release, whereas direct acetylcholine administration induces asymmetrical changes (Besson et al 1982; Kemei et al 1983). On the hemisphere opposite to the 6-OHDA lesion we found a significant decrease in the activity of GAD in the entopeduncular nucleus and the globus pallidus after a survival time of 4 and 8 weeks respectively. These changes could be due to the simultaneous effect of connections on the entopeduncular nucleus and substantia nigra arising for example from the contralateral striatum or substantia nigra (Gerfen, Staines, Arbuthnott and Fibiger, 1982; Consolazione, Bentivoglio, Goldstein and Toffano, 1985).

Recently the glucose utilization technique has shown that

the metabolic activity in globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra is affected in parallel in response to dopamine stimulation (Brown and Wolfson, 1978; Wooten and Collins, 1983). The results of the present study complement work on discrete localization of metabolic activity since with this kind of mapping, changes of a particular neurotransmitter cannot be discriminated.

Increases in enzyme activity after deafferentation like the ones reported here, could be produced by sprouting of the terminal field (Stachowiak, Bruno, Snyder, Stricker and Zigmond, 1984), increased affinity of the enzyme for its cofactor (Miller and Walters, 1979), or increased production of the enzyme (Thoenen, 1974; Porter and Martin, 1984). Since there is no damage of GABAergic cells, sprouting of GABA neurones seems unlikely. The activity of GAD was estimated under saturating cofactor concentrations, therefore our estimates cannot exclude the possibility of increased affinity. There is evidence suggesting that depolarization and subsequent release of GABA, shifts the balance of a direct feedback control of presynaptic GABA synthesis leading to the formation of a higher proportion of active GAD (Porter and Martin, 1984). Changes in the synthesis of GAD could be the explanation for our results, these changes in synthesis could occur as a result of altered synaptic transmission impinging onto GABAergic cells in the structures studied.

In conclusion the experiments have revealed time related changes in the activity of GAD in the striatum, globus pallidus, and substantia nigra ipsilateral to a unilateral dopaminergic

denervation of the striatum. On the contralateral hemisphere the activity of GAD varied only on the entopeduncular nucleus and the globus pallidus. In general the changes in enzyme activity probably reflect a compensation in a chain of GABAergic synapses which occur as a result of the loss of the nigral input to the striatum. It can be proposed that the time related modifications in the activity of GAD reveal the presence of a physiological compensatory process such as sprouting of contralateral dopamine fibres.

ACKNOWLEDGEMENTS

This experiment was partially supported by a grant from CONACyT. We thank R. de Anda and J. Mendez for their technical assistance, Dr. M. Perez de la Mora for his advise and encouragement and Drs. F. Mens, C. Klatt and G. Meza for their help in the determination of dopamine concentrations and the activity of CAT.

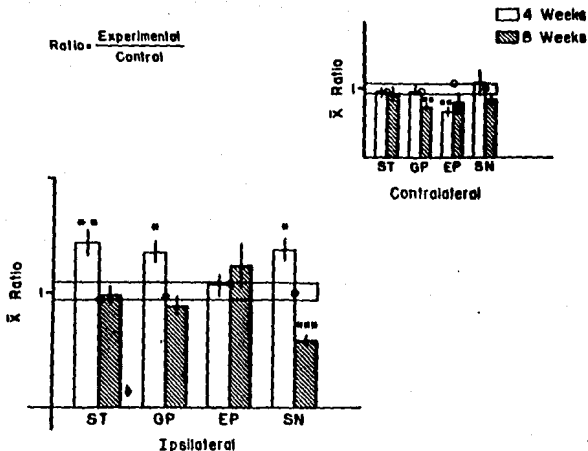


Fig. 1 The horizontal bar indicates the mean ratio \pm SEM of GAD activity between both sides of the brain of the 12 untreated controls, the open circles indicate the control ratio of GAD activity for each individual structure within that control group. The columns indicate the ratio between the lesioned side and the corresponding control value for each structure at four (open columns) or 8 weeks (hatched columns). A ratio close to 1.0 indicates that both control and experimental sides have very similar values. * $p < 0.02$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. In the insert the ratios between the control group and the intact contralateral side are depicted to show that eventhough the contralateral changes in the activity of GAD in striatum and substantia nigra are not statistically significant, the enzyme activity is significantly low in the entopeduncular nucleus at 4 weeks and in the globus pallidus after a survival time of 8 weeks.

TABLE I

EFFECT OF A UNILATERAL 6-OHDA LESION ON THE ACTIVITY OF GAD					
<u>POSTOPERATIVE SURVIVAL TIME</u>					
		4 WEEKS		8 WEEKS	
STRUCTURES	CONTROL GROUP	LESIONED	UNLESIONED	LESIONED	UNLESIONED
STRIATUM*	68(16)	95(21)	65(8)	66(7)	57(4)
GLOBUS PALLIDUS+	251(30)	354(36)	245(28)	218(17)	186(10)
ENTOPEDUNCULAR+	180(34)	194(25)	114 (7)	215(46)	119(39)
SUBSTANTIA NIGRA+	347(46)	478(40)	377(56)	204(21)	289(15)

The results are expressed as mean \pm (SD) of nMoles/Hr/mg protein. Since the values for both sides of the brain in the control group did not differ the data was pooled in one mean.

* Tissue from a single animal; + pool of 3 different brains.

REFERENCES

1. Albers, W. and Brady, R.J. (1959). The distribution of glutamic decarboxylase in the nervous system. *Biol. Chem.*, 234: 926-928.
2. Arbuthnott, G.W. (1974). Spontaneous activity of single units in the striatum after unilateral destruction of the dopamine input. *J. Physiol.* 399: 121.
3. Bernstein, A.L. (1964). *A Handbook of Statistics Solutions for Behavioral Sciences*. Holt, Rinehart and Winston, New York, pp. 32-35.
4. Besson, M.J., Kemel, M.L., Gauchy, C. and Glowinski, J. (1982). Bilateral asymmetrical changes in the nigral release of (3H)GABA induced by unilateral application of acetylcholine in the cat caudate nucleus. *Brain Res.* 241: 241-248.
5. Brown, L.L. and Wolfson, L.I. (1978). Apomorphine increases glucose utilization in the substantia nigra, subthalamic nucleus and corpus striatum of rat. *Brain Res.* 140: 188-193.
6. Creese, I., Burt, D. R., Snyder, S. H. (1977) Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science*, 197: 596-598.

7. Consolazione, A., Bentivoglio, M., Goldstein, M. and Toffano, G. (1985) Evidence for crossed catecholaminergic nigrostriatal projections by combining wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase retrograde transport and tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. *Brain Res.*, 338: 140-143.
8. DiChiara, G., Porceddu, M.L., Morelli, M. Mulas, M.L. and Gessa, G.L. (1979). Substantia nigra as an output station for striatal dopaminergic responses: role of a GABA-mediated inhibition of pars reticulata neurons. *Arch. Pharmac.* 306: 153-159.
9. Fonnum, F.A.J. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 24: 407-409.
10. Gale, J. and Casu, M. (1981). Dynamic utilization of GABA in substantia nigra: regulation by dopamine and GABA in the striatum and its clinical and behavioral implications. *Mol. Cell. Biochem.* 39: 369-405.
11. Garcia-Munoz, M, Nicolaou, N.M., Tulloch, I.F., Wright, A.K. and Arbuthnott, G.W. (1977). Feedback loop or output pathway in striato-nigral fibres? *Nature, Lond.* 265:363-365.
12. Garcia-Munoz, M., Patino, P., Wright, A.J. and Arbuthnott, G.W. (1983). The anatomical substrate of turning behavior seen after lesions in the nigro-striatal dopamine system. *Neurosci.* 8:87-95.

13. Gerfen, C.R., Staines, W.A., Arbuthnott, G.W. and Fibiger, H.C. (1982). Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *J. Comp. Neurol.* 207:283-303.
14. Hattori, T., Fibiger, H.C. and McGeer, P.L. (1975) Demonstration of a pallido nigral projection innervating dopaminergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 162: 487-504.
15. Hornikiewicz, O., Lloyd, K.G. and Davidson, L. (1976). The GABA system, function of the basal ganglia and Parkinson disease. In: *GABA in Nervous System Function* (Roberts, E., Change, T.N. and Tower, D.B., Eds.), pp. 479-486. Raven Press, New York.
16. Keller, R., Oke, A., Mefford, I. and Adams, R.N. (1976). Liquid chromatographic analysis of catecholamines routine assay for regional brain mapping. *Life Sci.* 19: 995-1004.
17. Kemel, M.L., Gauchy, C., Romo, R., Glowinski, J. and Besson, M.J. (1983). In vivo release of 3H-GABA in cat caudate nucleus and substantia nigra. II involvement of different thalamic nuclei in bilateral changes induced by nigral application of muscimol. *Brain Res.* 272: 331-340.
18. König, J.F. R. and Klippel, R.A. (1963). *The Rat Brain: A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem* Williams and Wilking, Baltimore.

19. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J.J. (1951). Protein measurement with Folin-phenol reagent. *Biol. Chem.* 193: 265-275.
20. Mao, C.C., Cheney, D.L., Marco, E., Revuelta, A. and Costa E. (1977). Turnover times of gamma-aminobutyric acid and acetylcholine in nucleus caudatus, nucleus accumbens, globus pallidus and substantia nigra: effects of repeated administration of haloperidol. *Brain Res.* 132: 375-379.
21. Marco, E., Mao, C.C., Revuelta, A., Peralta, E. and Costa, E. (1978). Turnover rates of gamma-aminobutyric acid in substantia nigra, nucleus caudatus, globus pallidus and nucleus accumbens of rats injected with cataleptogenic and not cataleptogenic antipsychotics. *Neuropharmacology*, 17: 589-596.
22. McGeer, P.L., McGeer, E.G., Wada, J.A. and Jung, E. (1971). Effects of globus pallidus lesions and Parkinson's disease on brain glutamic acid decarboxylase. *Brain Res.* 32: 425-431.
23. McGeer, P.L., Fibiger, H.C., Hattori, T., Sing, U.K., McGeer, E. G. and Maler, L. (1974). Biochemical anatomy of the basal ganglia. *Adv. Behav. Bio.* 10: 27-48.
24. McGeer, E.G. and McGeer, P.L. (1976). Enzymes associated with the metabolism of catecholamines, acetylcholine and GABA in human controls and patients with Parkinson's disease and Huntington's chorea. *J. Neurochem.* 26: 65-76.

25. Miller, L.P. and Walters, J.R. (1979). Effects of depolarization on cofactor regulation of glutamic acid decarboxylase in substantia nigra. *J. Neurochem.* 33: 533-539.
26. Nagy, J.I., Carter, D.A. and Fibiger, H.C. (1978). Anterior striatal projections to the globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra in the rat. *Brain Res.* 158:15-29.
27. Perez de la Mora, M., Fuxe, K., Hokfelt, T. and Ljungdahl, A. (1977). Evidence for a nerve impulse-dependent GABA accumulation in the substantia nigra after treatment with gamma-glutamylidrazide. *Neurosci. Lett.* 5: 75-82.
28. Porter, T.G. and Martin, D.L. (1984). Evidence for feedback regulation of glutamate decarboxylase by gamma aminobutyric acid. *J. Neurochem.* 43: 1464-1467.
29. Pritzel, M., Sarter, M., Morgan, S. and Huston J.P. (1983). Interhemispheric nigrostriatal projections in the rat bifurcating nigral projections and loci of crossing in the diencephalon. *Brain Res. Bull.* 10: 385-390.
30. Pritzel, M., Huston, J.P. and Sarter, M. (1983). Behavioral and neuronal reorganization after unilateral substantia nigra lesions: evidence for increased interhemispheric nigrostriatal projections. *Neurosci.* 9: 879-888.

NSL 04189

γ -Aminobutyric acid release in the globus pallidus *in vivo* after a 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra of the rat

J. Segovia¹, U. Tossman², M. Herrera-Marschitz², M. Garcia-Munoz¹ and U. Ungerstedt²

¹Department of Neuroscience, Institute of Cellular Physiology, National University of Mexico, 04510 Mexico, D.F. (Mexico); and ²Department of Pharmacology, Karolinska Institute, 104 01 Stockholm 60 (Sweden)

(Received 12 May 1986; Revised version received 1 July 1986; Accepted 4 July 1986)

Key words: 6-Hydroxydopamine — Globus pallidus — Substantia nigra — Basal ganglia — Rat

This experiment was designed to determine whether the release of γ -aminobutyric acid (GABA) in the globus pallidus (GP) is affected by a lesion of the nigrostriatal pathway. Rats were lesioned with 6-hydroxydopamine 4 weeks prior to study of the *in vivo* release of GABA. A microdialysis probe was stereotaxically implanted in halothane-anesthetized animals in a vertical position on both GPs. The perfusates were analyzed for their GABA content with a high performance liquid chromatography technique. Compared to unlesioned controls, a marked decrease in the overflow of GABA was observed in the GP contralateral to the lesion, whereas the ipsilateral GP showed a slight increase. The differences between the sides were exaggerated after KCl (100 mmol) administration. The results are discussed in terms of a possible bilateral influence of dopamine terminals in the striatum on GABA transmission.

It is known from electrophysiological and biochemical studies that the striatopallidal [10, 12, 24] pathway is primarily inhibitory [14, 17] and probably contains γ -aminobutyric acid (GABA) as a neurotransmitter [7]. In fact the globus pallidus (GP) is an area rich in GABA [1] and glutamic acid decarboxylase, a marker enzyme for GABA-containing terminals [7]. Furthermore the striatum (St) sends a dense and topographically organized projection to the GP [4, 8], and GABA is topographically organized within the St and GP [7, 9]. The low levels of GABA and glutamic acid decarboxylase in the St and GP in both Parkinson's and Huntington's diseases suggest a role for GABAergic transmission in the GP in abnormal movements [6, 18]. In support of this idea GABAergic agonists injected into the GP induce an ipsiversive postural deviation (which turns into a continuous ipsiversive circling after DA receptor stimulation) [20]. It has been proposed, therefore, that dopamine (DA) facilitates the GABAergic systems in the GP.

Correspondence: M. Garcia-Munoz, IFC, UNAM, P.O. Box 70-600, 04510 Mexico, D.F. 359, Mexico.

The present study was designed to determine whether the release of GABA in the GP is affected by a lesion of the nigrostriatal pathway which will decrease DA levels in the St. The experiments involved the measurement of the release of endogenous GABA in the GP in vivo using the intracerebral microdialysis technique [23] after a unilateral lesion of the substantia nigra (SN) with 6-hydroxydopamine (6-OHDA).

Male Sprague-Dawley rats (140-160 g) were anesthetized with a mixture of air and halothane and mounted in a stereotaxic frame. Unilateral injections of 6-OHDA (8 µg, 6-OHDA-HCl dissolved in 4 µl of saline containing 0.2% ascorbate) were made using a 5-µl Hamilton syringe. The stereotaxic coordinates were 4.4 mm posterior, 1.2 mm lateral relative to the bregma suture and 7.8 mm vertical measured from the surface of the brain. Successfully denervated rats were selected following treatment with a low dose of apomorphine (0.05 mg/kg, s.c.) two weeks after the 6-OHDA injection. Rats showing a two-peak pattern of rotation were selected since this behavior reliably indicates a greater than 95% depletion of DA in the St [22].

GABA release was measured 4 weeks after the 6-OHDA lesion. Rats were anesthetized with halothane and the dialysis probes were stereotaxically implanted into both GPs (AP -1.3, L 3.0 and V -7.0 mm from bregma suture). Halothane was maintained during the whole experiment.

The dialysis cannulae (Carnegie Medicin, Solna, Sweden) had a molecular weight cut-off of 20,000 and the exposed surface of the membrane was 0.52 × 2.0 mm. The implanted probes were held in position by a micromanipulator of the stereotaxic instrument and perfused continuously with a Ringer solution containing (mM): Na⁺ 147, Cl⁻ 155.6, K⁺ 4, Ca²⁺ 2.3, pH 6.0, at a speed of 2 µl/min (CMA/100 microinfusion pump, Carnegie Medicin). Thirty minutes after the implantation of the probes, the perfusate collection began. The samples were collected every 10 min (20 µl) for 60 min, with KCl (100 mM final concn.) being added to the perfusion medium for the final 10-min fraction. At the end of the experiment animals were killed by an overdose of anesthesia and the brain dissected out. Frozen sections (100 µm) were cut to verify the localization of the probes.

Perfusates were analysed for GABA using high performance liquid chromatography with fluorescence detection by the *o*-phthaldehyde derivatization method of Lindroth and Mopper [15]. An amount of 5 µl of perfusate were mixed with *o*-phthaldehyde reagent on an auto-sampler (WISP 710-B, Waters Ass.) and automatically injected after 1 min reaction; GABA was separated from other amino acids by reversed phase chromatography using stainless-steel columns packed with Nucleosil resin (5 µm particle size) and eluted by a 0.05 M (NaH₂PO₄) phosphate buffer (pH 5.3)-methanol gradient. The limit of the sensitivity of the assay was approximately 100 nmol.

Basal GABA release and the response to KCl in unlesioned control rats versus lesioned animals were tested for statistical difference using Student's *t*-test for unpaired samples [2]. Only data from animals with cannulae placed in the GP as verified by the histology were taken into account.

From in vitro studies it was determined that the relative recovery of GABA (25 pmol, 2 µl/min) across the dialysis membrane was 15-20%.

In control unlesioned rats basal levels of GABA in perfusates from the left and the right GP were, respectively, 1.75 ± 0.07 pmol/10 μ l and 1.87 ± 0.21 pmol/10 μ l. In lesioned animals GABA levels of GP perfusates were below the limit of detection on the side contralateral to the lesion, whereas the ipsilateral side showed a non-significant tendency to increase (2.26 ± 0.45 pmol/10 μ l). After a depolarizing pulse of high potassium a 34-fold increase in the overflow of GABA was observed in control animals. In comparison, the ipsilateral GP on the lesioned group showed a stimulated release of GABA which was 46 times higher than prestimulation values, a response that was significantly greater than observed for the unlesioned group ($P < 0.01$). On the GP contralateral to the lesion, GABA was detected after potassium stimulation, but the absolute levels observed were approximately 3 times less than the increase observed in control rats ($P < 0.01$) (Table I).

Spontaneous and potassium-evoked [3 H]GABA release has been observed in the GP of cats [3, 13] and further, electrical stimulation of the St results in an increased release of [3 H]GABA in the ipsilateral and contralateral GP [3]. These results suggest the existence of processes contributing to regulation of GABAergic synapses in the St and GP not only on the ipsilateral but also on the contralateral side. Symmetric and asymmetric reciprocal regulations are also evident for other neuronal systems of the basal ganglia such as the nigrostriatal DA pathways [5, 19]. The significant decrease in GABA overflow in the GP contralateral to the lesion, even after a depolarizing pulse with potassium as seen in these experiments, also suggest reciprocal regulations between the St and GP on both hemispheres [3]. The slight increase in basal GABA release observed in the GP ipsilateral to the 6-OHDA lesion could possibly induce a compensatory hyperactivity in the intact contralateral DA system. There is a reported increase of DA release in the contralateral St after a 6-OHDA lesion of the nigrostriatal pathway [25]; this increase might be expected to decrease GABA overflow as indeed we found.

It has been suggested that the release of GABA from the St is highly dependent on GABA synthesis. Since the presence of 3-mercaptopyruvic acid (glutamic acid decarboxylase inhibitor) in the perfusion medium produces a drop in GABA release [13], the finding that no basal GABA overflow was detected in the GP contralateral to the 6-OHDA lesion suggests that the newly synthesized neuronal pool of GABA is depleted in the GP after the lesion of striatal DA nerve terminals. This is further

TABLE I
IN VIVO RELEASE OF ENDOGENOUS GABA IN THE GLOBUS PALLIDUS

The results are expressed as pmol/10 μ l of perfusate. The values were corrected for in vitro recovery. All data are mean \pm S.D. of 4-6 individual determinations.

	Ipsilateral	Contralateral
Control	1.75 ± 0.07	1.87 ± 0.21
Lesioned	2.26 ± 0.45	Undetectable
Control + KCl	60.25 ± 25.8	62.85 ± 10.7
Lesioned \pm KCl	83.64 ± 26.5	22.25 ± 10.4

supported by the fact that potassium-stimulated release on the contralateral side did not reach control levels.

It is possible that the lack of DA innervation of the St is the single factor causing the changes in the release of GABA in the GP; however, depletion of DA in the nucleus accumbens is also likely to occur following the lesion [21] and this could in turn stimulate the release of GABA in the GP [11]. Furthermore a small direct dopaminergic input to the GP from the SN has been described [16], and it is also possible that the lesion of this pathway might contribute to the effects observed.

In summary the present study demonstrates that although in control rats the release of GABA in the GP is similar on both hemispheres, the decrease of DA levels in one St produces a very marked decrease on the contralateral side. These changes in GABA were accentuated by a depolarizing pulse of potassium. It is suggested that GABA release in the GP is subject to control by DA terminals in the St.

J.S. was recipient of a scholarship from the Swedish Institute and the National University of Mexico. We wish to express our appreciation to Agneta Eliasson for her technical expertise. The authors would like to thank Dr. G.W. Arbuthnot and Dr. T. Sharp for their critical reading of the manuscript.

- 1 Balcom, G.J., Lenox, R.H. and Meyerhoff, J.L., Regional aminobutyric acid level in rat brain determined by microwave fixation, *J. Neurochem.*, 14 (1975) 609-613.
- 2 Bernstein, A.L., *A Handbook of Statistics Solutions for the Behavioral Sciences*, Holt, Rinehart and Winston, New York, 1964, 145 pp.
- 3 Besson, M.J., Gauchy, C., Kemel, M.L. and Glowinski, J., In vivo release of ³H-GABA synthesized from ³H-glutamine in the substantia nigra and the pallido-entopeduncular nuclei in the cat. In G. DiChira and G.L. Gessa (Eds.), *GABA and the Basal Ganglia*, Raven Press, New York, 1981, pp. 95-103.
- 4 Brann, M.R. and Emson, P.C., Microinjection of fluorescent tracer combined with simultaneous immunofluorescent histochemistry for the demonstration of efferents from the caudate-putamen projection to the globus pallidus, *Neurosci. Lett.*, 16 (1980) 61-65.
- 5 Chesselet, M.F., Cheramy, A., Romo, R., Deshan, M. and Glowinski, J., GABA in the thalamic motor nuclei modulates dopamine release from the two dopaminergic nigrostriatal pathways in the cat, *Exp. Brain Res.*, 51 (1983) 275-282.
- 6 Coyle, J.T., Schwarcz, R., Benett, J.P. and Campochiaro, P., Clinical, neuropathological and pharmacologic aspects of Huntington's disease: correlates with a new animal model, *Prog. Neuro-Psychopharmacol.*, 1 (1977) 13-30.
- 7 Fonnum, F., Sottesfeld, Z. and Grofova, I., Distribution of glutamate decarboxylase, choline acetyltransferase and aromatic amino acid decarboxylase in the basal ganglia of normal and operated rats. Evidence for striatopallidal, striatoentopeduncular and striatonigral GABAergic fibres, *Brain Res.*, 143 (1978) 125-138.
- 8 Graybiel, A.M. and Ragsdale, C.N., Fiber connections of the basal ganglia, *Prog. Brain Res.*, 51 (1979) 239-283.
- 9 Jessel, T.M., Emson, P.G., Paxinos, G. and Cuervo, A.C., Topographic projections of substance P and GABA pathways in the striato- and pallido-nigral system. Biochemical and immunohistochemical study, *Brain Res.*, 152 (1978) 487-498.
- 10 Johnson, T.N., Topographic projection on the globus pallidus and the substantia nigra of selectively placed lesions in the pre-commissural caudate nucleus and putamen in the monkey, *Exp. Neurol.*, 33 (1971) 584-596.

- 11 Jones, D.L. and Mogenson, G.L., Nucleus accumbens to globus pallidus GABA projection: electrophysiological and iontophoretic investigations, *Brain Res.*, 188 (1980) 93-105.
- 12 Kemp, J.M., The termination of strio-pallidal and strio-nigral fibres, *Brain Res.*, 17 (1970) 125-128.
- 13 Korf, J., van der Kyden, A.M., Venema, K. and Postema, F., Distribution and release of GABA in the basal ganglia. In G. Dichiaro and G.L. Gessa (Eds.), *GABA and The Basal Ganglia*, Raven Press, New York, 1981, pp. 105-117.
- 14 Levine, M.S., Hull, C.D. and Buchwald, N.A., Pallidal and entopeduncular intracellular responses to striatal, cortical, thalamic and sensory inputs, *Exp. Neurol.*, 44 (1974) 448-460.
- 15 Lindroth, P. and Mopper, K., High performance liquid chromatography determination of subpicomole amounts of amino acid by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthalaldehyde, *Anal. Chem.*, 51 (1979) 1667-1674.
- 16 Lindvall, O. and Bjorklund, A., Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway, *Brain Res.*, 172 (1979) 169-173.
- 17 Malliani, A. and Purpura, P.P., Intracellular studies of the corpus striatum. II. Patterns of synaptic activities in lenticular and entopeduncular nucleus, *Brain Res.*, 6 (1967) 341-354.
- 18 McGeer, P.L., McGeer, E.G., Wada, J.A. and Jung, E., Effects of globus pallidus lesions and Parkinson's disease on brain glutamic acid decarboxylase, *Brain Res.*, 32 (1971) 425-427.
- 19 Pritzel, M., Huston, P.J. and Sarter, M., Behavioral and neuronal reorganization after unilateral substantia nigra lesions; evidence for increased interhemispheric nigrostriatal projections, *Neuroscience*, 9 (1983) 879-888.
- 20 Scheel-Krüger, J., The GABA receptor and animal behavior. In I.J. Enna (Ed.), *The GABA-receptors*, The Humana Press, New Jersey, 1983, pp. 215-253.
- 21 Ungerstedt, U., Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain, *Acta Physiol. Scand.*, Suppl. 307 (1971) 1-48.
- 22 Ungerstedt, U. and Herrera-Marschitz, M., Behavioral pharmacology of dopamine receptor mechanisms. In L. Sjöjarne, P. Hedqvist, H. Lagercrantz and A. Wennmalm (Eds.), *Chemical Neurotransmission: 75 Years*, Academic Press, New York, 1981, 326-375.
- 23 Ungerstedt, U., Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. In A.C. Marsden (Ed.), *Measurement of Neurotransmitter Release 'in vivo'*, John Wiley and Sons, New York, 1984, pp. 81-105.
- 24 Voneida, T.J., An experimental study of the course and destination of fibres arising in the head of the caudate nucleus in the cat and monkey, *J. Comp. Neurol.*, 115 (1960) 75-88.
- 25 Zetterström, T., Herrera-Marschitz, M. and Ungerstedt, U., Simultaneous measurement of dopamine release and rotational behaviour in 6-hydroxydopamine-denervated rats using intracerebral dialysis, *Brain Res.*, in press.