

11241 11
24.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

DEPARTAMENTO DE PSIQUIATRIA Y SALUD MENTAL

**LOS ANTICOLINERGICOS APLICADOS AL NUCLEO
SUBTALAMICO SUPRIMEN LA RIGIDEZ
MUSCULAR DEL PARKINSONISMO MEDICAMENTOSO.**

TESIS

para obtener el grado de

ESPECIALIDAD
en

PSIQUIATRIA INFANTIL Y DE LA ADOLESCENCIA

presenta

Gonzalo Flores Alvarez

Med. Cir., Psiquiatra, M. en C. y D. en C..

Directores de tesis:

Dr. Marcelo Salles Manuel

Dr. Hector Ortega

México, D.F., febrero de 1997.

1

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



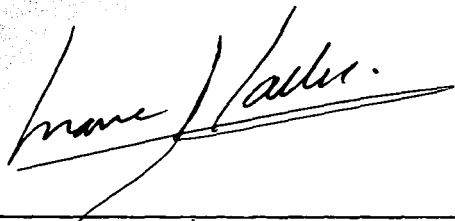
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

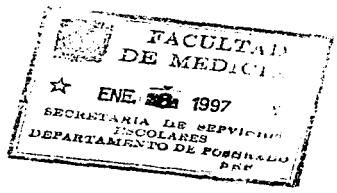
LOS DIRECTORES DE ESTA TESIS DAMOS LA APROBACION A LA MISMA. PARA QUE SE PERMITA REALIZAR AL DR. G. FLORES. EL EXAMEN PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALIDAD EN PSIQUIATRIA INFANTIL Y DE LA ADOLESCENCIA.



DR. MARCELO SALLES MANUEL



DR. HECTOR ORTEGA



I.- JUSTIFICACION.

El núcleo subtalámico (NST) es parte de los ganglios basales, recibe innervación colinérgica del núcleo del pedunculo pontino (Saper y Loewy, 1982; Jackson y Crossman, 1983) y, tal como lo han mostrado las investigaciones clinicopatológicas en humanos y los estudios experimentales en animales (Parent y Smith, 1987; Bergman y cols. 1990), esta estructura juega un rol importante en el control de la conducta motora (Albin y cols., 1989b), pero el papel funcional de la acetilcolina en este núcleo no está claro.

Recientes estudios en animales parkinsonicos han mostrado que la lesión bilateral del núcleo subtalámico produce una disminución marcada de la rigidez muscular (Bergman y cols., 1990). Además, de ser posible atenuar la rigidez muscular de ratas y primates con parkinsonismo medicamentoso al aplicar antagonistas glutamatérgicos en éste núcleo (Klockgether y Tursky, 1990; 1991; Klockgether y col., 1991).

El parkinsonismo medicamentoso es un efecto secundario muy frecuente provocado por el consumo de antagonistas dopaminérgicos o neurolepticos (fármacos de elección en el tratamiento de los trastornos psicóticos tanto en niños y adolescentes como en adultos), el cual es manejado con excelentes resultados con anticolinérgicos (trihexifenidil o biperiden), motivo por lo cual, se ha postulado la existencia de un balance acetilcolina/dopamina en los ganglios basales, especialmente en el caudo-putamen, pero hasta el momento actual no hay suficientes evidencias para aceptar esta hipótesis.

Todo lo anterior indica que, en el momento actual, el estudio del núcleo subtalámico y los anticolinérgicos constituyen una área de investigación de extraordinaria relevancia médica, especialmente dentro del campo de la psiquiatría, tanto del infante y adolescente como del adulto.

El presente trabajo tiene como finalidad contribuir al estudio del núcleo subtalámico y en especial al esclarecimiento del papel de los anticolinérgicos en este núcleo, para poder aportar más datos y de esta forma comprender mejor el mecanismo de acción de estos medicamentos, frecuentemente usados en el manejo de la rigidez muscular inducida por antagonistas dopaminérgicos (neurolépticos).

II.- ANTECEDENTES

Pocas áreas del cerebro han recibido tanta atención en el último cuarto de este siglo como los ganglios basales (GB) (Pycock y Kilpatrick, 1989). Para el clínico la razón de tan intenso interés en la investigación de los GB radica en el hecho de que su patología trae consigo desordenes del movimiento, ya que normalmente participan de manera relevante en la iniciación y en el control del movimiento (García-Rill y Skinner, 1987).

Para el psiquiatra tanto de niños y adolescentes como de adultos, el uso inteligente de medicamentos que sustituyan, modifiquen o recuperen parte de las funciones perdidas por la disfunción bioquímica de las neuronas, constituye un continuo desafío, al que se enfrenta cada

vez que inicia una terapia farmacológica.

Para el científico, los GB representan un sistema fascinante y complejo de vías neuronales interconectadas, con interacciones demostrables de neurotransmisores específicos y que le permiten, por manipulación selectiva de uno o más de los circuitos neuronales, modificar dramáticamente la conducta motora de los animales de laboratorio.

En la actualidad, existen modelos animales de los desordenes del movimiento que se observan en la clínica. Usando estos modelos, los neurocientíficos han aportado información valiosa para el entendimiento de la fisiopatología de los desordenes que ocurren en pacientes con afecciones de los ganglios basales, y han aclarado los mecanismos de acción de los medicamentos que se usan en la clínica para el control de dichos desordenes.

El parkinsonismo medicamentoso en la rata (rigidez muscular, hipocinesia o acinesia y temblor) constituye un modelo animal de gran utilidad, en el estudio de los efectos secundarios del bloqueo de la transmisión dopaminérgica en los GB y puede ser utilizado para conocer más a cerca de la fisiopatología de este trastorno en el humano y de esta forma entender mejor el mecanismo de acción de los medicamentos usados en su control, específicamente los anticolinérgicos.

A).- Características morfológicas de los ganglios basales.

Los ganglios basales están constituidos por estructuras telencefálicas (caudado, putamen

y globo pálido), diencefálicas (subtálamo) y mesencefálicas (sustancia nigra) (Berne y Levy, 1988), que se interconectan entre sí para constituir una organización muy compleja (Goldman-Rakic y Selemon, 1990), la cual juega un papel básico en el control de la conducta motora (Albin y cols., 1989b).

1.- Neostriado o caudoputamen.

Desde el punto de vista filogenético, el estriado se divide en neostriado (núcleos caudado y putamen), paleostriado (globo pálido) y arquiestriado (amígdala) (Brooks, 1986).

El neostriado o caudoputamen (Cpu) es la estructura aferente primaria de los ganglios basales, que en algunos mamíferos como la rata es una estructura única, en tanto que en otros, como en los primates las fibras de la cápsula interna lo dividen en dos porciones, la medial denominada caudado y la lateral, putamen (Albin y cols., 1989b).

En los primates el globo pálido se encuentra dividido en interno y externo. En muchos mamíferos, incluyendo a la rata, el homólogo del globo pálido interno es el núcleo entopeduncular, cuyas neuronas se localizan entre las fibras del tracto córticofugal; y la porción externa constituye el globo pálido propiamente dicho (Albin y cols., 1989b).

Las principales aferencias al Cpu son las proyecciones de la corteza, la sustancia nigra compacta (SNc), el tálamo, el núcleo del rafe dorsal y el núcleo subtalámico, formando las vías

nigro-estriatal, rafé-estriatal y córtico-estriatal, mientras que sus principales eferencias son al globo pálido externo, al núcleo entopeduncular y a la sustancia nigra reticulata (SNr), formando las vías estriato-palidal y estriato-nigral (Wickens, 1988; Albin y cols., 1989b; Alexander y Crutcher, 1990) (ver figura 1).

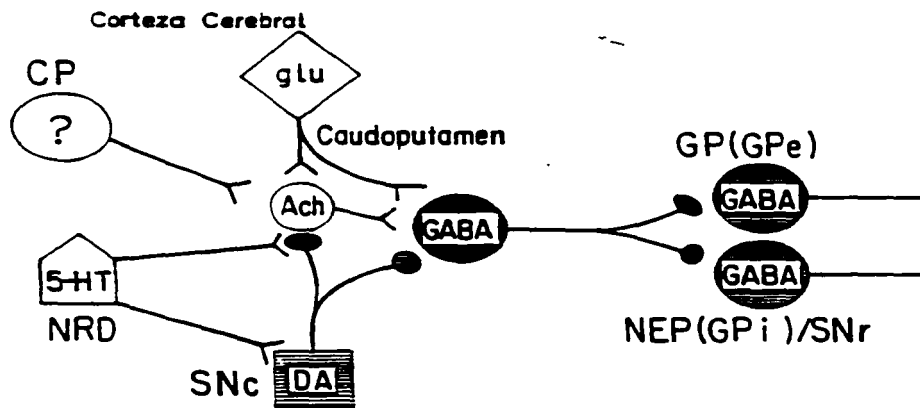


Figura 1. Diagrama simplificado de los principales circuitos de los ganglios basales. Las principales entradas al caudoputamen son: a) la corteza cerebral (glutamatérgica y de tipo excitatorio); b) el complejo parafascicular del tálamo (de tipo excitatorio, pero se desconoce su neurotransmisor); c) la SNc (dopaminérgica y presumiblemente tanto de tipo inhibitoria como excitatoria) y d) el núcleo del rafé dorsal (serotoninérgico y de tipo inhibitorio). Las principales proyecciones del caudoputamen son de tipo GABAérgico hacia el globo pálido y la SNr. (Abreviaturas: Ach, acetilcolina; CP, complejo parafascicular; DA, dopamina; GABA, ácido γ -aminobutírico; GPi, globo pálido interno; GPe, globo pálido externo; SNc, sustancia nigra compacta; SNr, sustancia nigra reticulata; NEP, núcleo entopeduncular; NRD, núcleo del rafé dorsal; 5-HT, serotonina) (figura tomada de Albin y cols., 1989b).

2.- Sustancia Nigra.

La sustancia nigra debe su nombre a la coloración oscura que le da la melanina de sus neuronas (Noback y Demarest, 1975) y constituye un grupo de células localizadas en el mesencéfalo. Comprende una parte rica en células, denominada compacta y una parte pobre en células, llamada reticulata (Fallon y Loughlin, 1985).

La SNc tiene la forma de un casquete que recubre la porción dorsomedial de la SNr (figura 2) y contiene los somas de las neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas. Sus principales eferencias son la vía nigro-estriatal (Fallon y Loughlin, 1985) y la vía nigro-subtalámica (Romansky y cols., 1979; Meibach y Katzman, 1979; Mintz y cols., 1986, Alexander y Crutcher, 1990). Otra salida (dendritas) es hacia la parte reticulata, cuya probable función sería modular la actividad GABAérgica en este sitio (Dray, 1978; Scheel-Kruger, 1986; Aceves y cols., 1992).

La SNr tiene la forma de un ovoide (figura 2) con una porción ventromedial que contiene neuronas pequeñas y una porción dorsolateral con neuronas medianas y grandes agrupadas en racimos (Fallon y Loughlin, 1985). Sus principales aferencias son las neuronas GABAérgicas que proviene del Cpu (Motles y cols., 1988; Albin y cols., 1989; Alexander y Crutcher, 1990; Pickel y Chan, 1990) que ejercen una acción inhibitoria sobre las neuronas de la SNr (Kilpatrick y cols., 1980) y las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico (Nauta y Cole, 1979; Carpenter y cols., 1981; Kita y Kitai, 1987; Parent y Smith, 1987) con efecto excitatorio sobre estas neuronas

(Nakanishi y cols., 1987; Robledo y Féger, 1990); otra aferencia son las terminales serotoninérgicas que proviene del núcleo del rafé (Dray, 1981; Parent y cols., 1983; Sandyk y Fisher, 1988). Las principales eferencias de la SNr-son al tálamo, al colículo superior y a la formación reticular (Anderson y Yoshiba, 1977; Albin y cols., 1989b; Alexander y Crutcher, 1990).

3.- Núcleo Subtalámico.

El núcleo subtalámico (NST) está localizado entre la sustancia nigra y el núcleo entopeduncular en la rata (ver figura 2) y debe su nombre a su posición por debajo del tálamo (Smith y cols., 1990). Es una estructura pequeña, lo que ha dificultado su estudio.

Las principales aferencias al NST provienen del globo pálido externo, de la SNC, de la corteza cerebral, del núcleo del rafé dorsal, del núcleo pedúnculo pontino y del complejo parafascicular (Féger y cols., 1979; Romansky y cols., 1979; Rouzaire-Dubois y Scarnati, 1987; Albin y cols., 1989a). Sus principales salidas son al globo pálido externo, al núcleo entopeduncular y a la SNr (94 % del total de las células del NST de la rata) (Van der Kooy y Hattori, 1980; Takada y cols., 1988). Otras de sus salidas son al Cpu y al núcleo pedúnculo pontino (Smith y cols., 1990), de esta forma se han descrito las vías subtálamo-palidal, subtálamo-nigral, subtálamo-estriatal y subtálamo-tegmental (Smith y cols., 1990) (figura 3).

Por estudios de microscopia electrónica y de luz ha quedado establecido que el NST está formado principalmente por neuronas Golgi tipo I, además de poseer pocas interneuronas (Rafols y Fox, 1976). Datos electrofisiológicos e inmunohistoquímicos han indicado que estas neuronas usan ácido glutámico como su neurotransmisor (Albin y cols., 1989a; Robledo y Féger, 1990).

Por otra parte, existe controversia sobre la función de la vía subtálamo-palidal, ya que hay trabajos que indican que la estimulación de las neuronas del NST tienen un efecto inhibitorio sobre las neuronas palidales (Rouzaire-Dubois y cols., 1980; Perkins y Stone, 1980), en tanto, que otras publicaciones sugieren lo contrario (Robledo y Féger, 1990). En relación, al efecto que ejerce la vía subtálamo-nigral hay suficientes datos que sugieren una acción excitatoria sobre las neuronas de la SNr (Nakanishi y cols., 1987; Robledo y Féger, 1990).

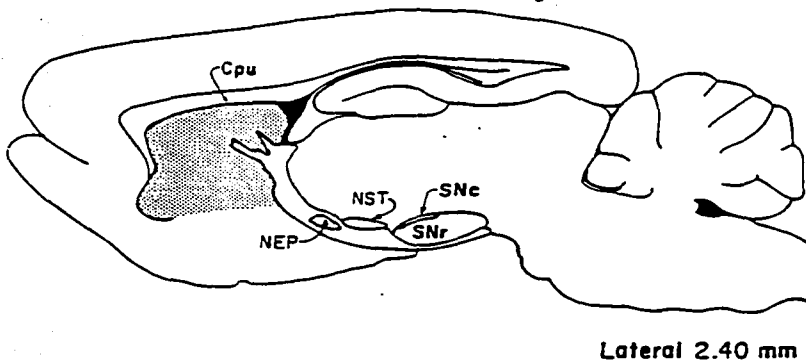


Fig 2.- Esquema simplificado de las relaciones anatómicas del núcleo subtalámico con el resto de los ganglios basales. Se muestra la cercanía anatómica del NST con los núcleos de salida de los ganglios basales (SNr/NEP) y la SNc. Abreviaturas: Cpu, caudoputamen; NEP, núcleo entopeduncular; NST, núcleo subtalámico, SNc, sustancia nigra pars compacta; SNr, sustancia nigra pars reticulata (figura tomada de Paxinos y Watson, 1989).

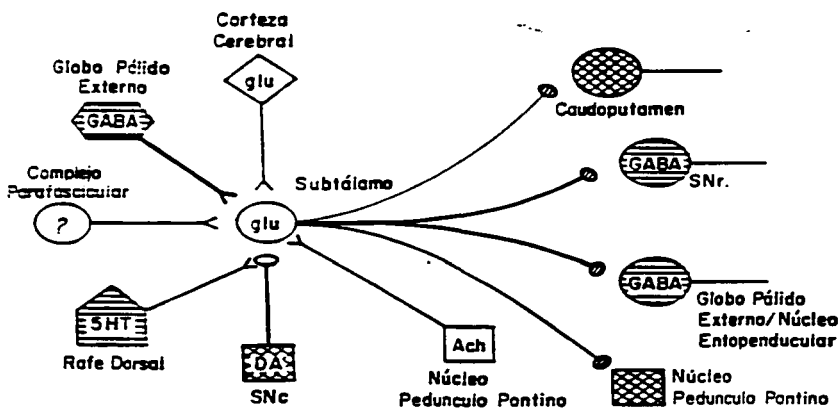


Fig. 3.- Diagrama de las principales vías aferentes y eferentes al núcleo subtalámico. Las principales entradas al núcleo subtalámico son: a) la corteza cerebral (glutamatérgica y de tipo excitatorio); b) el globo pálido externo (GABAérgico y de tipo inhibitorio); c) el núcleo del rafe dorsal (serotoninérgico pero se desconoce su efecto); d) el complejo parafascicular (se desconoce su neurotransmisor); e) del núcleo pedúnculo pontino (colinérgico y de tipo excitatorio) y f) la SNc (dopaminérgica y en estudio su efecto). Las principales proyecciones son glutamatérgicas hacia el globo pálido externo, el núcleo entopeduncular y la SNr. Abreviaturas: Ach, acetilcolina; DA, dopamina; GABA, ácido γ -aminobutírico; Glu, ácido glutámico, 5-HT, serotonina; SNc, sustancia nigra pars compacta; SNr, sustancia nigra pars reticulata.

3a.- Evidencias de que el núcleo subtalámico recibe inervación colinérgica.

Actualmente existen pocos trabajos dirigidos al estudio de la transmisión colinérgica en el NST. La mayor parte de ellos son estudios morfológicos los cuales han demostrado que el NST recibe inervación procedente del núcleo del pedúnculo pontino (NPP) (Moon y Graybiel, 1980; Nomura y cols., 1980; Carpenter y cols., 1981; Saper y Loewy, 1982; Jacson y Crossman, 1983) el cual contiene en su mayor parte neuronas colinérgicas (Armstrong y cols., 1983; Mesulam y cols., 1983; Satoh y cols., 1983; Tago y Cols., 1989). Además del NPP, se ha reportado que también el núcleo del tegmento laterodorsal (NTLD) proyecta terminales colinérgicas al NST (Woolf y Butcher, 1986)

Los estudios electrofisiológicos que apoyan estos trabajos son aun más escasos, pero se ha observado que la estimulación eléctrica del NST produce activación antidrómica de las neuronas del NPP y al estimular de la misma forma el NPP se produce activación ortodrómica de las neuronas del NST (Hammond y cols., 1983).

Desafortunadamente hasta la fecha no se han reportado mediciones directas del contenido de acetilcolina en el NST; sin embargo, se ha demostrado que en humanos el NST contiene acetiltransferasa de colina, la enzima responsable de la síntesis de la acetilcolina, así como acetilcolinesterasa, la enzima responsable de su degradación (McGeer y McGeer, 1976; Xuereb y cols., 1990; Mesulam y cols., 1992). Asimismo, se ha observado que la acetiltransferasa de colina está presente en el NST de la rata (Kobayashi y cols., 1975) y el gato (Nieouillon y

Dusticier, 1980).

Mediante el método de hibridización *in situ* se ha demostrado también que las neuronas del NST contienen mRNA (RNA mensajero) que expresa receptores de tipo muscarínico (Weiner y cols., 1990), en tanto que en otros estudios se ha reportado que existen en este núcleo sitios de unión para ${}^3\text{H}$ -nicotina aunque en muy poca cantidad.

Todos estos datos que sugieren que el NST recibe inervación de tipo colinérgico se ven reforzados por la observación de que la aplicación iontóforética de acetilcolina produce excitación de las neuronas del NST en la rata anestesiada. Este efecto es antagonizado por la atropina y la escopolamina (antagonistas colinérgicos de tipo muscarínico) pero no por el antagonista nicotínico, mecamilamina (Fèger y cols., 1979).

A pesar de estos resultados, actualmente existe considerable controversia en relación a la magnitud de la inervación del NPP hacia el NST de la rata (Nomura y cols., 1980; Woolf y Butcher, 1981; Jackson y Crossman, 1983; Sugimoto y Hattori, 1984; Carpenter y Jayaraman, 1990). Pero aún en los estudios que han dado lugar a las más fuertes objeciones se reporta la existencia de al menos unas pocas neuronas positivas a la acetiltransferasa de colina retrógradamente marcadas en el NPP por la inyección de marcadores en el NST (Rye y cols., 1987). Sin embargo, esto contrasta con el hecho de que en el humano, la inervación colinérgica es muy densa e incluso se ha reportado que este núcleo se encuentra inmerso en una matriz de axones que contienen una gran cantidad de acetiltransferasa de colina (Mesulam y cols., 1992).

A decir de estos autores es posible que una parte de la inervación se origine en el NPP y otra provenga del NTLD.

3b.- Impotencia del núcleo subtalámico en el control motor.

La lesión del núcleo subtalámico provoca un cuadro clínico caracterizado por violentos movimientos involuntarios de tipo balístico y coreoatetoide (Adams, 1981), cuya entidad nosológica se ha denominada hemibalismo (lesión unilateral) o balismo (lesión bilateral) (Crossman y cols., 1984; Albin y cols., 1989a; Robledo y Féger, 1990).

Se trata de un trastorno invalidante. En muchos casos es el resultado de lesiones agudas cerebrovasculares, usualmente infartos, en el núcleo subtalámico o sus conexiones (Klawans y cols., 1976). El 60 % de los pacientes con este síndrome mueren dentro de las primeras seis semanas del inicio del cuadro clínico y las causas más frecuentes son: agotamiento, neumonía o insuficiencia cardíaca congestiva. Los casos que sobreviven presentan severas disquinesias por varios años (Lea-Plaza y Uiberall, 1945).

Se ha observado una mayor incidencia de hemibalismo en pacientes con tratamiento crónico con neurolépticos (antagonistas dopaminérgicos) (Van Rossum, 1966; Klawans y cols., 1976), por lo cual se ha sugerido que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos podría estar involucrado en la fisiopatología del balismo (Klawans y cols., 1976).

Los trabajos experimentales muestran también que la lesión del núcleo subtalámico produce discinesia en primates (Carpenter y cols., 1950; Hammond y cols., 1979). En éste último estudio la aparición de movimientos anormales se produjo al tercer día después de la lesión unilateral con ácido kaínico. Dichos movimientos se presentaron en el lado controlateral de la lesión, fueron de origen proximal, estereotipados además de acompañarse de hipotonía y bradicinesia (Hammond y cols, 1979).

Por otra parte, la inyección de antagonistas GABAérgicos en el NST también provoca la aparición de hemibalismo en el primate (Crossman y cols, 1984). En la rata, la aplicación de bicocolina en el NST produce disquinesia caracterizada por movimientos repetidos de cabeza y extremidades. La bicocolina bloquea la acción GABAérgica que ejerce el globo pálido sobre las neuronas del NST causando un incremento en su frecuencia de disparo. Sin embargo, después de la excitación sostenida ocurre una inhibición por despolarización de las neuronas del NST, a la cual se atribuye la aparición de los síntomas (Féger y cols., 1992).

4.- Enfermedad de Parkinson y el Parkinsonismo medicamentoso (efecto secundario de los neurolépticos)

En 1817, James Parkinson describe la enfermedad que lleva su nombre. Dentro del cuadro clínico, los signos más importantes e incapacitantes de la enfermedad son la rigidez muscular, la acinesia (extrema dificultad para iniciar movimientos de tipo voluntario) y el temblor en reposo. Un siglo más tarde, se descubrió que la enfermedad estaba asociada a la pérdida

(degeneración) de las células pigmentadas de la pars compacta de la sustancia nigra (Zigmond y cols., 1990). En 1960, Ehringer y Hornykiewicz vieron que la enfermedad estaba acompañada por una drástica reducción del contenido de dopamina en los núcleos caudado y putamen. Este hallazgo hizo evidente el relevante papel de la inervación dopaminérgica de los núcleos caudado y putamen en el control de la actividad motora. El hecho de que la rigidez muscular, la acinesia y el temblor de la enfermedad pudiera controlarse con L-DOPA (Marsden y Parkes, 1977), enfatizó aun más el relevante papel de la inervación dopaminérgica en el control de la actividad motora. Desde entonces a la fecha se acepta, casi en forma universal, que la enfermedad de Parkinson se debe a la pérdida (o a la reducción mayor del 80 %) de la acción dopaminérgica en los núcleos caudado y putamen, de aquí que los trasplantes de tejido dopaminérgico hasta ahora hayan sido realizados en estos núcleos (Lindvall, 1989).

Por otro lado, con el descubrimiento de los neurolépticos, se comenzaron a observar severos trastornos motores como resultado del uso de estos fármacos (efectos colaterales), tales como la acatisia, las distonias de torción, la discinesia tardía, etc., y pronto se comenzaron a controlar algunos de estos trastornos motores con drogas anticolinérgicas (trihexifenidil y biperiden), con buenos resultados (Burke y cols., 1986). Con base en estos datos clínicos, se comenzó a postular la existencia de un balance acetilcolina-dopamina, que pudiera explicar el efecto de los anticolinérgicos sobre los síntomas parkinsonianos (rigidez muscular, hipocinesia y temblor) producidos por los neurolépticos o presentes en la enfermedad de Parkinson. Por otra parte, los anticolinérgicos son extimulantes del SNC y en consecuencia, pueden producir severo insomnio y excitabilidad (Arcadi y cols., 1992).

La rigidez muscular de la enfermedad de Parkinson o provocada por el uso terapéutico de los neurolépticos se explica, en parte por la excesiva inhibición de las neuronas del globo pálido externo (como consecuencia de la pérdida de la acción inhibitoria de la dopamina sobre las neuronas GABAérgicas estriatales que proyectan a este núcleo) (DeLong, 1990), lo que conduciría a la desinhibición de las neuronas subtalámicas, las que son tónicamente inhibidas por las palidales (figura 4). La desinhibición de las neuronas subtalámicas provocaría un incremento de la entrada excitatoria sobre las neuronas entopeduncular-talámicas y nigro-talámicas (GABAérgicas). A esto hay que sumar una disminución de la entrada (GABAérgica) inhibitoria sobre las neuronas de la SNr/núcleo entopeduncular (vía estriato-nigral) por la pérdida de la acción excitatoria de la dopamina (como consecuencia de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas o del bloqueo de los receptores dopaminérgicos por los neurolépticos) sobre las neuronas estriatales que proyectan a estos núcleos (figura 4). La desinhibición de las neuronas de la SNr/núcleo entopeduncular causaría un incremento inhibitorio en la salida hacia el colículo superior y al tálamo (figura 4) (Albin y cols., 1989b; Bergman y cols., 1990; DeLong, 1990). Ambas circunstancias traerían como consecuencia una disminución de la entrada excitatoria tálamo-cortical (Albin y cols., 1989b; DeLong, 1990), lo cual explicaría la disminución del movimiento.

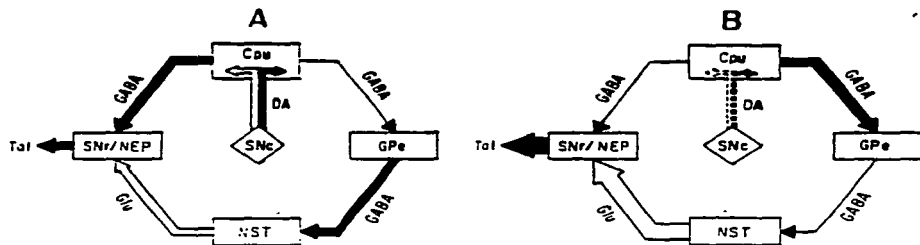


Figura 4.- Esquema simplificado de las conexiones funcionales de los ganglios basales. Las flechas oscuras indican conexiones inhibitorias, las claras representan uniones excitatorias, mientras que el grosor de las mismas indica el grado de esta actividad. (A) Condición normal. (B) Enfermedad de Parkinson. (Abreviaturas: Cpu, caudoputamen; DA, dopamina; GABA, ácido γ -amino butírico; Glu, ácido glutámico; GPe, globo pálido externo; NEP, núcleo entopeduncular; SNc, sustancia nigra pars compacta; SNr, sustancia nigra pars reticulata; Tal, tálamo) (figura adaptada de Bergman y cols., 1990).

La destrucción bilateral del núcleo subtalámico disminuye la rigidez muscular y la acinesia en el primate con enfermedad de Parkinson (Bergman y cols., 1990). Esto se explica, ya que la pérdida de la entrada excitatoria a la SNr/NEP, por la destrucción de las neuronas subtalámicas, traería una disminución de la entrada inhibitoria (GABAérgica) al tálamo y en estas circunstancias, se desinhibiría la vía tálamo-cortical, lo que explicaría la disminución de la acinesia. Por otra parte, la aplicación en el núcleo subtalámico o en la SNr/NEP de antagonistas glutamatérgicos, en la rata parkinsónica (Klockgether y Turski, 1990) o en el mono parkinsónico (Klockgether y cols., 1994), produce una disminución de la rigidez muscular, lo que revela el

trascendente papel que juega la actividad de las neuronas subtalámicas en las diferentes manifestaciones al bloquear la transmisión dopaminérgica.

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antecedentes presentados con anterioridad apoyan la relevante participación del núcleo subtalámico en la fisiopatología de la rigidez muscular del parkinsonismo medicamentoso, además de la existencia de una inervación colinérgica sobre este núcleo. De tal forma que se sabe que la sobreactividad de las neuronas del NST juega un papel crucial en la sintomatología que se observa en modelos animales de parkinsonismo medicamentoso y si se considera que la entrada colinérgica a este núcleo es de naturaleza excitatoria, como lo indican los estudios electrofisiológicos (Feger y cols, 1979; Lacey y cols., 1990) y estudios de conducta realizados en nuestro laboratorio (Flores y cols., 1993), es factible sugerir que el bloqueo de la acción colinérgica a nivel de este núcleo podría modificar alguno de los síntomas que se observa en este trastorno. Una idea interesante que surge de todos estos datos, es que el NST podría ser uno de los sitios de acción de los fármacos anticolinérgicos que se emplean para aliviar la rigidez y la acinesia en los pacientes parkinsonicos. Esto implica suponer que la actividad de las neuronas del núcleo subtalámico, que ocurre en un estado parkinsonico, se debe al menos en parte, a la acción colinérgica en el NST, cuyo efecto excitatorio aumenta al carecer este núcleo de la influencia GABAérgica inhibitoria procedente del globo pálido externo. Finalmente, contamos con los antecedentes y el modelo animal adecuado para poder estudiar este

primer planeamiento.

Es poca la información que se tiene en la literatura acerca del tipo de receptor colinérgico involucrado en el efecto de la acetilcolina en este núcleo, lo que nos plantea la necesidad de estudiar también que tipo de receptor media este efecto. Se uso el registro unitario extracelular en rebanadas aisladas del diencefalo que contienen el núcleo subtalámico.

IV.- HIPOTESIS.

La hipótesis de la presente tesis propone que el bloqueo de la transmisión colinérgica juega un papel importante en el control de la sobreactividad de las neuronas subtánicas causada por el bloqueo de la transmisión dopaminérgica (parkinsonismo medicamentoso), lo cual se traduce en una disminución de la rigidez muscular en el síndrome parkinsoniano.

V.- OBJETIVOS.

A fin de validar o rechazar la hipótesis propuesta se plantearon los siguientes objetivos:

1.- Confirmar el efecto excitatorio del agonista colinérgico (carbacol) sobre las neuronas del núcleo subtalámico.

1.1 Cuantificar el efecto del este agonista colinérgico sobre la frecuencia de disparo de las neuronas subtalámicas.

2.- Determinar la influencia de los antagonistas colinérgicos, sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NST extimuladas por el agonista colinérgico, carbacol.

3.- Establecer a través de que receptor colinérgico se ejerce el efecto de la acetilcolina sobre las neuronas del NST.

4.- Determinar el efecto de los antagonistas muscarínicos aplicados localmente en el núcleo subtalámico, sobre la rigidez muscular de la rata con parkinsonismo medicamentoso.

VL- MATERIAL Y METODOS.

A).- Animales de experimentación.

Se usaron ratas Wistar machos con control de luz-obscuridad (12 X 12 hrs., con inicio de la luz a las 6:00 hrs), con alimentación y agua ad libitum. Se usaron animales de 160 a 180 gr para obtener las rebanadas del núcleo subtalámico para registro unitario extracelular y de 280 a 290 gr. para la implantación de cánulas al núcleo subtalámico.

B) Experimentos Electromiográficos.

1) Implantación de las cánulas al núcleo subtalámico.

Las aplicación de cánulas se realizó, previa anestesia con hidrato de cloral (300 mg/Kg, ip), con un aparato estereotáxico David Kopf (con la barra de los incisivos en 3.3 mm). Se implantó estereotáxicamente una cánula guía metálica de 12.5 mm de longitud y 0.45 mm de diámetro externo, en el núcleo subtalámico. Los antagonistas colinérgicos se administraron mediante una cánula de inyección que se introdujo por la cánula guía. Las coordenadas estereotáxicas para situar la punta de la cánula guía 2 mm arriba del núcleo subtalámico fueron: 2.6 mm posterior a bregma; 2.1 mm lateral-derecho de la línea media y 5.3 mm abajo de la superficie de la corteza cerebral. Una vez implantada la cánula, los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz-obscuridad por lo menos durante siete días para su recuperación.

2) Registro de la actividad locomotora.

Para la evaluación de la actividad locomotora se uso un actiméto, el cual consiste de una caja acrílico de 44 cm de largo por 22 cm de ancho y 22 cm de altura, la cual tiene acoplados ocho fotodiodos a lo largo de su eje longitudinal. Cuando la rata tiene movimiento, el haz de luz infrarroja se corta, lo cual activa el contador y de esta forma se obtienen las cuentas en relación al tiempo.

La actividad locomotora de los animales en condiciones control y experimentales se llevó a cabo bajo control de luz, temperatura (21 a 24 °C) y entre las 10:00 y las 14:00 del día.

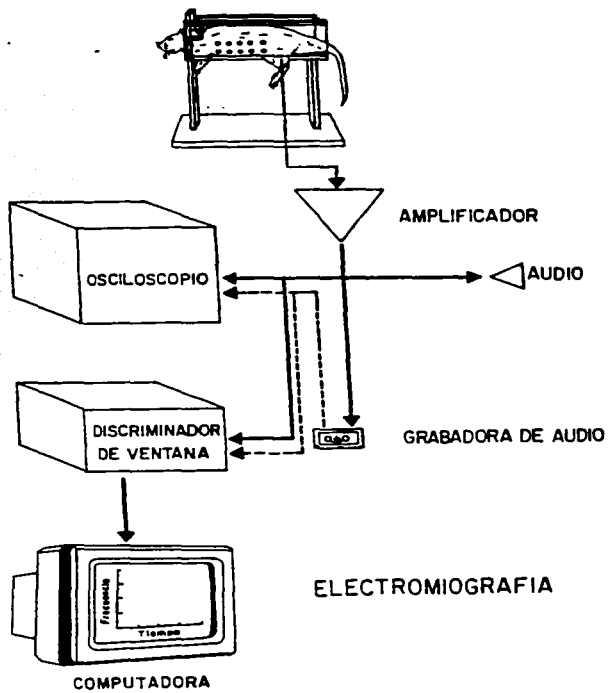
3) Registro de la actividad electromiográfica del músculo gastrocnemius-soleus.

Después de la medición de la actividad locomotora, las ratas fueron colocadas individualmente en una caja de plexiglass con aberturas en el fondo por las cuales pendían las extremidades del animal. El registro de la actividad tónica espontánea del músculo gastrocnemius-soleus se obtuvo del animal despierto y habituado a las condiciones experimentales (figura 5), mediante la inserción percutánea de un par de electrodos-aguja de platino (Grass Inst. Co., Quincy, MA) en el músculo gastrocnemius-soleus. Luego de obtener un registro basal durante 30 minutos, se aplicó en el NST 0.25 µl del vehículo (solución en la cual se disolvió la droga) y se monitoreó la actividad electromiográfica por otros 30 minutos, para finalmente se procedió al tratamiento farmacológico administrando pirenzepina (1 µg/0.25 µl de PBS), 4-DAMP (0.5 µg/0.25 µl de PBS) o AF-DX 116 (1 µg/0.25 µl de ácido láctico al 4 %) en el NST. El monitoreo de la actividad electromiográfica se realizó durante 120 minutos después de la aplicación del fármaco. Las señales eléctricas fueron amplificadas y filtradas (100 Hz-10 KHz), y se almacenaron en una cinta de audio para analizarse posteriormente (figura 5). Los histogramas de frecuencia de las unidades motoras se obtuvieron discriminando las amplitudes de las señales almacenadas y al procesarlas usando una computadora PC compatible y programación previamente descrita (Soto y Vega, 1987).

4) Verificación anatómica del sitio de aplicación de la cánula.

Después de cada experimento previa anestesia, los animales fueron decapitados y sus cerebros removidos y sumergidos por cuatro semanas en una solución amortiguada de fosfatos (pH = 7.4) con formaldehído al 4 %. Luego se separaron aquellas regiones necesarias para verificar la localización de las cánulas a través de cortes sagitales de 60 μm y se colorearon por medio de la técnica de Nissl.

Figura 5.- Esquema simplificado del equipo para medir la actividad electromiográfica. Se coloca a la rata en la caja de acrílico y con las extremidades sin recibir apoyo. Una vez que el animal se hubo adaptado a los electrodos-aguja de platino y a las condiciones experimentales, se realizó el registro de las unidades motoras del músculo gastrocnemius-soleus.



C) Experimentos Electrofisiológicos.

La obtención de rebanadas para obtener un buen registro electrofisiológico, extracelular, consistió en dos fases (Aghajanian y Rasmussen, 1981).

1) Fase de solución de sacarosa fría: Previa anestesia con hidrato de cloral (300 mgr/Kg, i.p.), se procedió a disecar la región precordial y a perfundir el SNC por una transcardial por medio de 50 ml de solución de sacarosa fría, con la siguiente composición (mM): KCl, 5.0; MgCl₂, 1.0; NaHCO₃, 26.0, CaCl₂, 2.0; ascorbato 0.2; d-glucosa, 10.0 y sacarosa 220.0, con un pH de 7.4. La solución fue saturada con una mezcla gaseosa conteniendo 95%/5% de O₂/CO₂. Posteriormente los animales fueron decapitados y los cerebros extraídos rápidamente. Mediante un vibratomo se obtuvieron rebanadas sagitales de 400 µm de espesor, las que se incubaron en la misma solución por 15 minutos.

2) Fase de solución normal a temperatura ambiente. Se reemplazó la solución, libre en sodio por una solución de Ringer- Henseleit con la siguiente composición (mM): NaCl, 126; KCl, 5.0; MgCl₂, 1.0; NaHCO₃, 26.0, CaCl₂, 2.0; ascorbato 0.2 y d-glucosa, 10.0.

La solución fue saturada con una mezcla gaseosa conteniendo 95%/5% de O₂/CO₂ y con un pH de 7.4. El tejido se dejó incubando por lapso de 60 minutos a la temperatura ambiente antes de realizar el registro.

La rebanada se montó en la cámara de registro (figura 6), que tenía una temperatura en el baño de 30°C y por medio de un microelectrodo de vidrio llenado con NaCl 2 M y con una resistencia de 8-12 MΩ se obtuvo el registro unitario extracelular.

Las neuronas registradas fueron tratadas primero con carbacol a diferentes concentraciones, para obtener una curva dosis-respuesta (100nM a 10 μM) y después con carbacol (500 nM) solo o en presencia de uno de los siguientes fármacos: pirenzepina, trihexifenidil, AF-DX 116, 4-DAMP, mecamilamina o nicotina. Las drogas fueron disueltas en la solución de Ringer-Heinseleit y agregadas al baño y tres minutos después de agregar la droga se procedió al lavado con la solución de Ringer-Heinseleit hasta recuperar la frecuencia basal de disparo. En algunas células se estudió el efecto de la aplicación sostenida de carbacol (15 minutos).

Las señales eléctricas obtenidas, fueron amplificadas y almacenadas en una cinta e audio para luego analizarse (figura 12). Los histogramas de frecuencia de estas unidades extracelulares se obtuvieron discriminando las amplitudes de las señales almacenadas, para su procesamiento usando una computadora PC compatible y el programa denominado "Infig" creado por Soto y Vega, (1987) (figura 6).

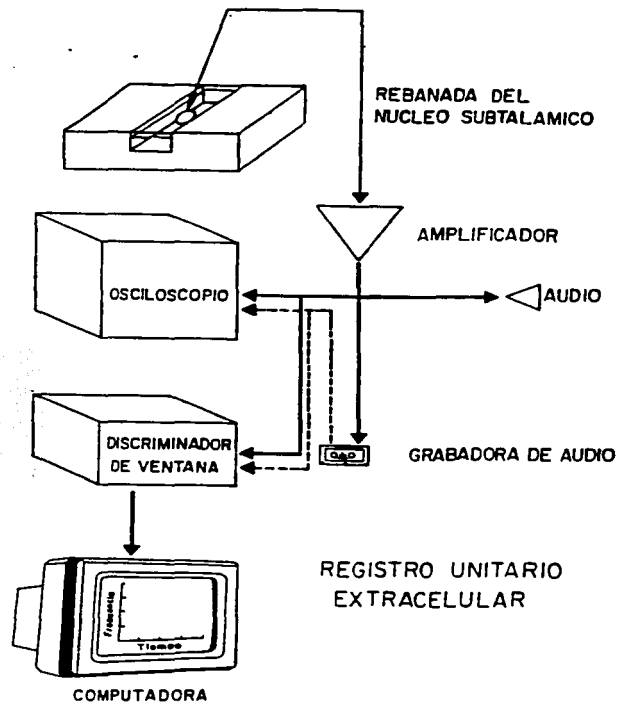


Figura 6.- Diagrama simplificado del equipo para realizar los registros unitarios extracelulares. Se montó la rebanada en la cámara de registro. La temperatura en el baño fue de 30°C. El electrodo de trabajo era de vidrio lleno de una solución de NaCl 2 M y con una resistencia de 8-12 MΩ. Los registros se almacenaron en una cinta de audio para su posterior análisis.

D) Estadística.

La significancia se determinó por el análisis de varianza y las pruebas de Fisher y Duncan. El criterio de significancia fue $p < 0.05$.

VII.- RESULTADOS.

A) EXPERIMENTOS ELECTROMIOGRAFICOS.

1.- Efecto de la reserpina o el haloperidol sobre la actividad motora y la actividad electromiográfica en el músculo *gastrocnemius-soleus*.

Como es conocido, la reserpina disminuye los niveles de catecolaminas en el cerebro, en tanto que el haloperidol (neuroléptico) bloquea la transmisión dopaminérgica, y en consecuencia, en ambos casos se provocan síntomas similares a los que se aprtecian en la enfermedad de Parkinson (Parkinsonismo medicamentoso). Las ratas tratadas con reserpina (5 mg/Kg i.p.) o con haloperidol (3 mg/Kg i.p.) mostraron un decremento significativo de la actividad locomotora (hipocinesia). Esta se evaluó durante una hora, 120 minutos después de la administrado del fármaco. El promedio de cuentas acumuladas del grupo control en una hora fue $1,039 \pm 126$ ($n=10$), en tanto que las ratas tratadas con reserpina tuvieron un promedio de 58 ± 10 ($n=14$) y las ratas tratadas con haloperidol tuvieron un promedio de 108 ± 19 ($n=6$). Estos animales presentaron además actividad electromiográfica en el músculo extensor *gastrocnemius-soleus*

(figura 7) en las condiciones de registro ya mencionadas. En contraste, los animales que no recibieron fármaco alguno (control), no mostraron actividad electromiográfica en las mismas condiciones (figura 7).

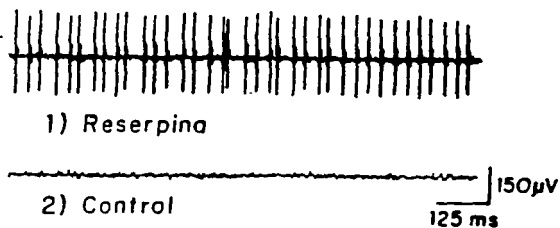


Figura 7.- Efecto del parkinsonismo medicamentoso sobre el tono muscular. Registro electromiográfico en el músculo *gastrocnemius-soleus*. Se muestra el registro de la actividad espontánea de una unidad motora. 1) Registro obtenido de un animal tratado con reserpina. 2) registro obtenido de un animal control.

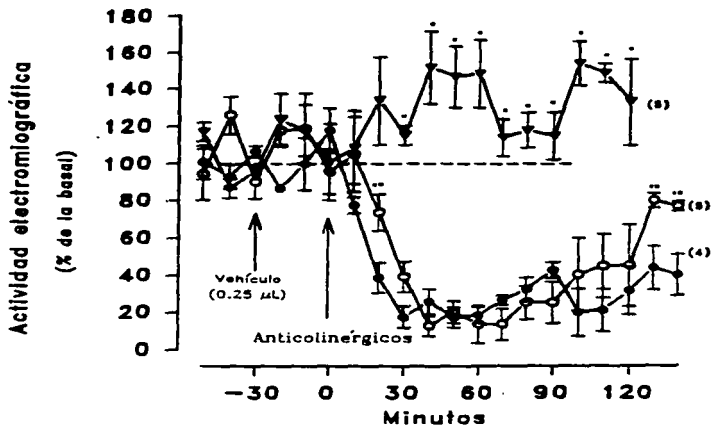
2) Efecto de los antagonistas muscarínicos aplicados en el núcleo subtalámico, sobre la actividad electromiográfica del músculo gastrocnemius-soleus.

La aplicación local de pirenzepina (1 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$) o 4-DAMP (0.5 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$), antagonistas muscarínicos M_1 y M_3 , respectivamente, en el NST causó un rápido decremento de la actividad electromiográfica en la rata con parkinsonismo medicamentoso (figs. 8 y 9), que alcanzó su máximo valor (85 % por debajo del nivel basal) a los 100 minutos después de la administración del fármaco (figura 8 y 9). El decremento se mantuvo por más de dos horas, después de lo cual se observó una clara tendencia a recuperar el nivel basal.

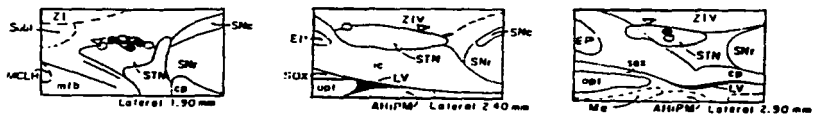
La aplicación del antagonista M_2 , AF-DX 116 (1 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$) no causó decremento de la actividad electromiográfica. Al contrario, se observó un incremento no significativo con respecto a la basal (figura 8 y 9).

Figura 8. Efecto de los antagonistas muscarínicos M_1 y M_2 , aplicados en el núcleo subtalámico, sobre la rigidez muscular en la rata reserpinizada. Se registró la actividad electromiográfica espontánea del músculo gastrocnemius-soleus de la extremidad posterior derecha y fue expresado como porcentaje de la basal. Los fármacos se aplicaron en el núcleo subtalámico del lado derecho. A) Después de obtener un registro basal de 30 minutos se aplicó el vehículo y treinta minutos después, se administró los antagonistas colinérgicos. Los puntos representan la media \pm el error estándar del número de experimentos, expresado entre paréntesis, realizados en cada grupo. * $p < 0.05$ con respecto a los a los grupos con 4-DAMP y pirenzepina y ** $p < 0.05$ con respecto al grupo con 4-DAMP. B) Diagramas ampliados del atlas de Paxinos y Watson (1986) en donde se muestran los sitios de aplicación de los fármacos en el NST. STN = núcleo subtalámico.

A)



B)



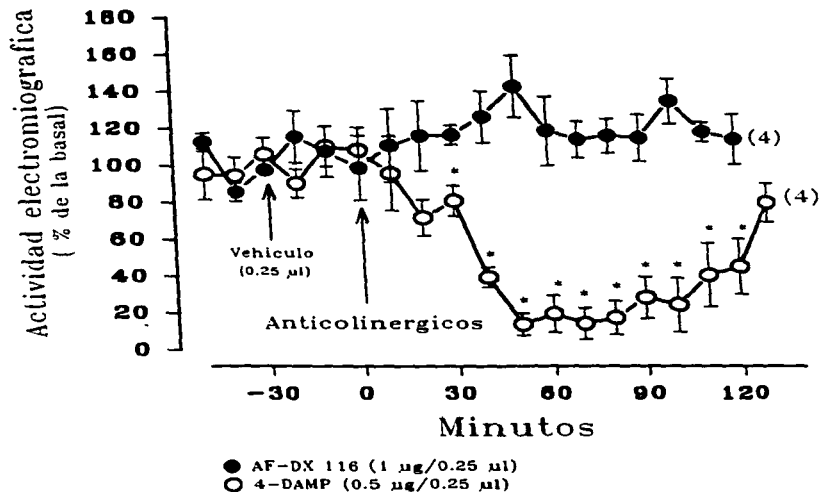


Figura 9. Efecto de los antagonistas muscarínicos M_1 y M_2 , aplicados en el núcleo subtalámico, sobre la rigidez muscular en la rata neuroleptizada (haloperidol 3 mg/Kg i.p.). Se registró la actividad electromiográfica espontánea del músculo *gastrocnemius-soleus* de la extremidad posterior derecha y fue expresado como porcentaje de la basal. Los fármacos se aplicaron en el núcleo subtalámico del lado derecho. Después de obtener un registro basal de 30 minutos se aplicó el vehículo y treinta minutos después, se administró los antagonistas colinérgicos. Los puntos representan la media \pm el error estándar del número de experimentos, expresado entre paréntesis, realizados en cada grupo. * $p < 0.05$ con respecto al grupo con AF-DX 116.

D) EXPERIMENTOS DE REGISTRO UNITARIO EXTRACELULAR.

1) Actividad espontánea.

Las células del núcleo subtalámico presentan actividad espontánea, la cual fluctúa de 4 a 40 hz con ráfagas espontáneas hasta de 90 Hz. Los registros muestran la forma de los potenciales de acción (figura 10).

2) Efecto del carbacol sobre la frecuencia de disparo espontáneo de las neuronas subtálamicas.

El agonista colinérgico, carbacol, produjo un incremento de la frecuencia de disparo espontánea (figuras 11). Como se puede observar en la curva dosis-efecto (figura 12), la IC_{50} fue de 500 nM, por lo cual se decidió utilizar esta concentración, para efectuar los estudios farmacológicos.

La aplicación sostenida de carbacol (500 nM) durante 15 minutos provocó un incremento en la frecuencia de disparo y ráfagas de hasta 90 Hz. Este efecto se mantuvo durante todo el tiempo que duró la aplicación del fármaco y desapareció después del lavado con solución de Krebs normal, volviendo la neurona a su nivel basal de disparo (figura 13).



Figura 10.- Respuesta unitaria extracelular de una neurona subtalámica. Registro de la actividad espontánea. Se usó un electrodo de vidrio con una resistencia de 8 M Ω . Para mayor detalles sobre el procedimiento véase el texto

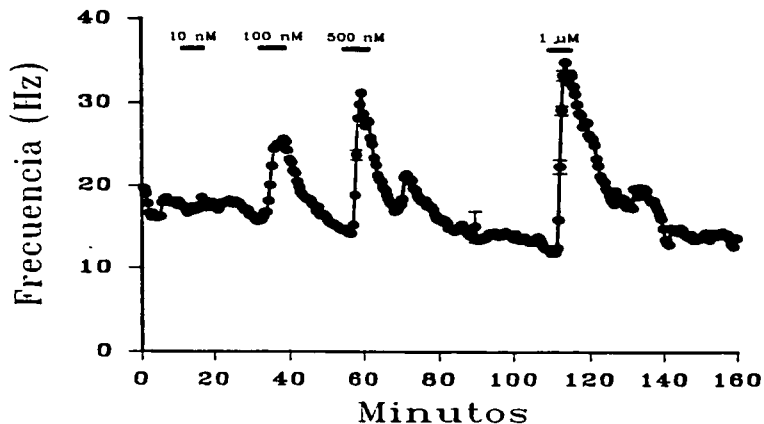


Figura 11. Efecto del carbacol sobre el disparo espontáneo de las neuronas del núcleo subtalámico. La frecuencia de disparo de las neuronas del núcleo subtalámico se monitoreó mediante la técnica de registro unitario extracelular en la rebanada sumergida. El carbacol se añadió al medio de baño por lapsos de 3 minutos (barras) a las concentraciones indicadas en la figura. Después de cada aplicación se procedió al lavado con Krebs normal. Cada punto representa el promedio de la frecuencia obtenida en un lapso de 30 segundos. La figura representa un registro único ($n = 10$).

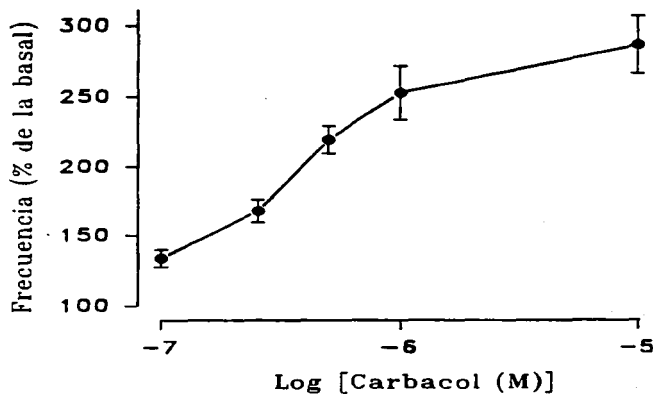


Figura 12.- Curva concentración-efecto del carbacol sobre la frecuencia de disparo espontánea de las neuronas subtalámicas. Las actividad de las neuronas del núcleo subtalámico se monitoreó mediante la técnica de registro unitario extracelular en la rebanada sumergida. El carbacol se añadió al medio por lapsos de 3 minutos a las concentraciones indicadas en la figura. Después de cada aplicación se procedió al lavado con Krebs normal. Cada punto representan la media de la frecuencia en Hz. ± el error estándar (n= 10-60).

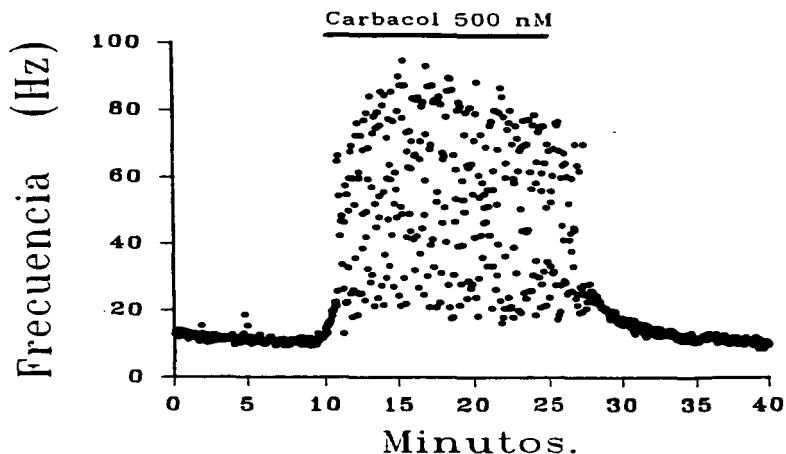


Figura 13. Efecto de la aplicación sostenida del carbacol sobre el disparo espontáneo de las neuronas del núcleo subtálmico. Se monitoreó la actividad de las neuronas del núcleo subtálmico por medio de la técnica de registro unitario extracelular en la rebanada sumergida. El carbacol se añadió al medio de baño por un periodo de 15 minutos (barra obscura) a la concentración indicada en la figura. La dispersión de los puntos se debe a que la célula presentó disparo en ráfagas seguido por breves lapsos de silencio. Después de los 15 minutos de aplicación se procedió al lavado con Krebs normal. La figura representa un registro único.

3.- Bloqueo de la respuesta excitatoria del carbacol por medio de los antagonistas muscarínicos M₁, pirenzepina y trihexifenidil.

Los antagonistas selectivos de los receptores muscarínicos M₁, pirenzepina y trihexifenidil (Artane) bloquearon el incremento de la frecuencia inducido por carbacol (figura 14 a y 14b). El bloqueo fue parcial cuando el trihexifenidil, a una concentración de 500 nM, se co-administró con carbacol aplicado a una concentración de 500 nM (figura 14b). El bloqueo fue del 100 % y 95 % para trihexifenidil y pirenzepina respectivamente (figura 14a y 14b).

4.- Bloqueo de la excitación inducida por carbacol por el antagonista muscarínico M₂, AF-DX 116.

El antagonista muscarínico M₂, AF-DX 116, no bloqueó (100 %) el efecto del carbacol sobre las neuronas del NST. La figura 15 muestra los resultados de un experimento, en el cual el AF-DX 116, bloqueó parcialmente (10 %) el efecto del carbacol (500 nM).

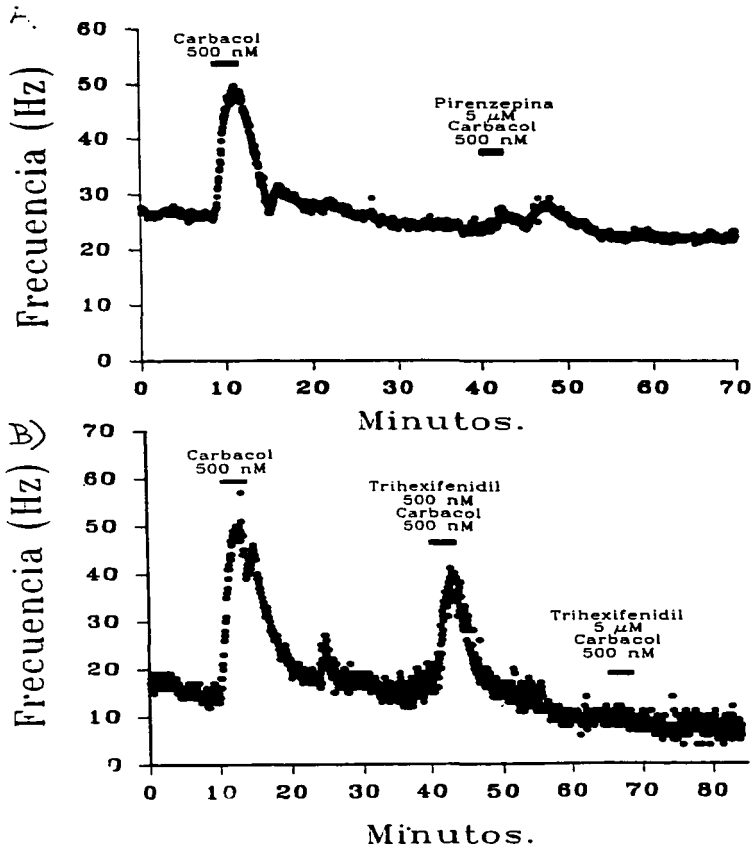


Figure 14. Bloqueo del efecto del carbacol por los antagonistas M1, pirenzepina y trihexifenidil. Se monitoreó la frecuencia de disparo de las células del núcleo subtálmico mediante la técnica ya descrita. El carbacol se añadió al medio de baño por un periodo de 3 minutos (barra oscura) a la concentración indicada en la figura. Posteriormente, **A)** la pirenzepina o **B)** el trihexifenidil se co-administraron con el carbacol (barras oscuras). La figura representa un registro único (n=6)

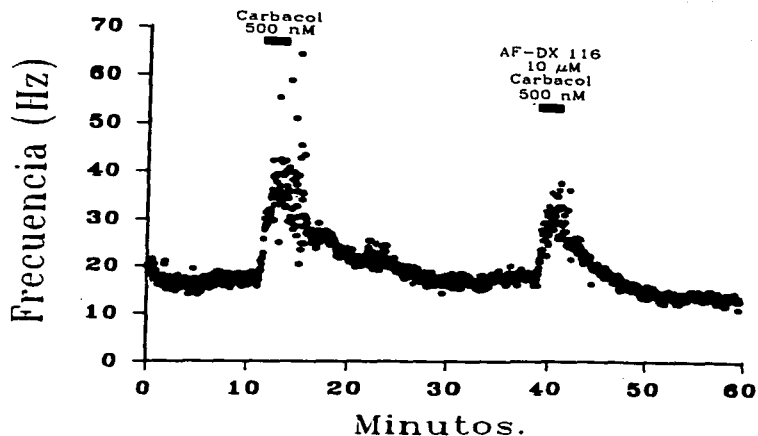


Figura 15. Efecto del antagonista muscarínico M_2 , AF-DX 116. La frecuencia de disparo de las células del núcleo subtálmico se monitoreó mediante la técnica ya descrita. El carbacol se añadió al medio por un periodo de 3 minutos (barra oscura) a la concentración indicada en la figura. Posteriormente se procedió al lavado con Krebs normal hasta obtener el valor basal de la frecuencia de disparo. Después se añadió AF-DX 116 + carbacol al medio de baño (barra oscura) a las concentraciones indicadas. La figura representa un registro único ($n = 5$).

5.- Bloqueo del efecto excitatorio inducido por carbacol por el antagonista muscarínico M_3 , 4-DAMP.

El antagonista selectivo de los receptores muscarínicos M_3 , 4-DAMP, bloqueó el efecto excitatorio del carbacol sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del núcleo subtalámico. El bloqueo total a la respuesta se logró con 200 nM (n=5) del fármaco, concentración 25 veces menor que la empleada con los antagonistas M_1 . La figura 16 muestra los resultados de un experimento en el cual 100 nM de 4-DAMP bloqueó un 76 % de la excitación inducida por carbacol, en tanto que un 200 nM bloqueó totalmente el efecto del carbacol.

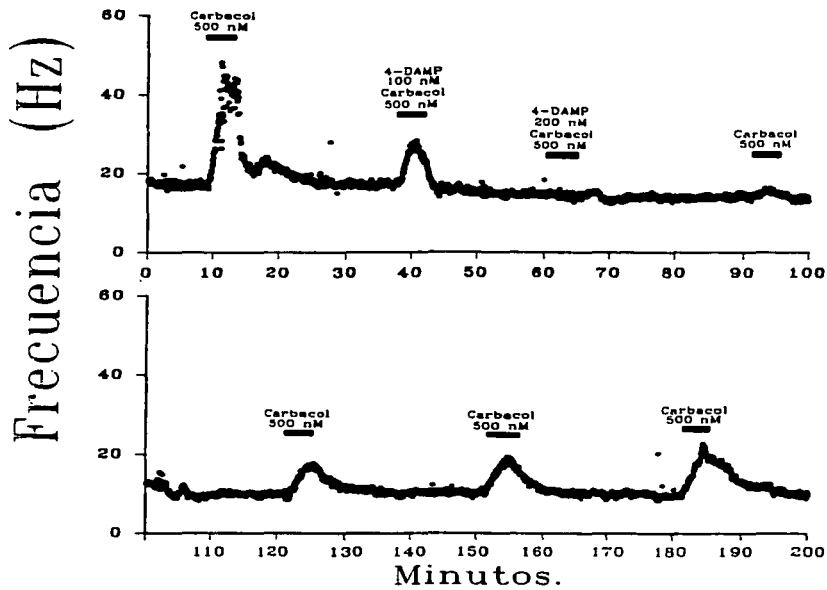
6.- Curvas de concentración-efecto de los antagonistas muscarínicos sobre la respuesta al carbacol (500 nM)..

Se cuantificó la respuesta de diferentes concentraciones de los antagonistas muscarínicos (figura 17). La curva dosis-efecto para el antagonista selectivo de los receptores M_3 , 4-DAMP, está francamente desplazada a la izquierda, con una IC_{50} de 90 nM, en tanto que la IC_{50} para el antagonista selectivo de los receptores M_1 , pirenzepina, fue de 1.5 μ M, finalmente la IC_{50} para el antagonista selectivo de los receptores M_2 , AF-DX 116, fue de 6 μ M. Estos resultados indican, que se requiere una concentración 67 y 17 veces mayor de AF-DX 116 y pirenzepina, respectivamente, para conseguir el mismo efecto del antagonista selectivo de los receptores M_3 , 4-DAMP.

7.- Efecto de la mecamilamina y nicotina sobre la respuesta inducida por carbacol.

El antagonista selectivo de los receptores nicotínicos, mecamilamina, no bloqueó el efecto del carbacol sobre las neuronas del NST ($n = 4$). En concordancia con estos resultados, la nicotina no tuvo efecto ($n = 4$). En la figura 18 se muestran los resultados de un solo experimento en que la mecamilamina ($10 \mu\text{M}$), no bloqueó la respuesta al carbacol, así también. la nicotina ($100 \mu\text{M}$) no tuvo efecto en la misma neurona.

Figura 16. Bloqueo del efecto del carbacol por el antagonista muscarínico M3, 4-DAMP. La frecuencia de disparo de las células del núcleo subtálmico se monitoreó mediante la técnica de registro unitario extracelular en la rebanada sumergida. El carbacol se añadió al medio de baño por un periodo de 3 minutos (barra oscura) a la concentración indicada en la figura. Posteriormente se aplicó 4-DAMP + carbacol (barra oscura) utilizando el antagonista a concentraciones de 100 nM y 200 nM. Puede observarse que la respuesta inicial al carbacol no se recuperó aún 120 minutos después de la segunda aplicación del 4-DAMP. La figura representa un registro único ($n=9$).



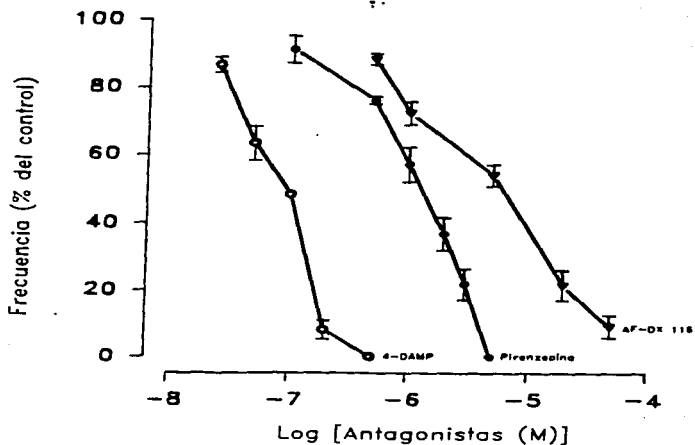


Figura 17.- Curvas de concentración-efecto de los antagonistas muscarínicos sobre la respuesta excitatoria inducida por carbacol (500 nM). Primero, se obtuvo el % del efecto de 500 nM de carbacol (control) y luego, se cuantificó el % del efecto de carbacol (500 nM) en presencia de diferentes concentraciones de los antagonistas muscarínicos (pirenzepina, AF-DX 116 y 4-DAMP). Los puntos corresponden al promedio \pm el error estándar del % del control de un total de 80 neuronas (5 células por punto).

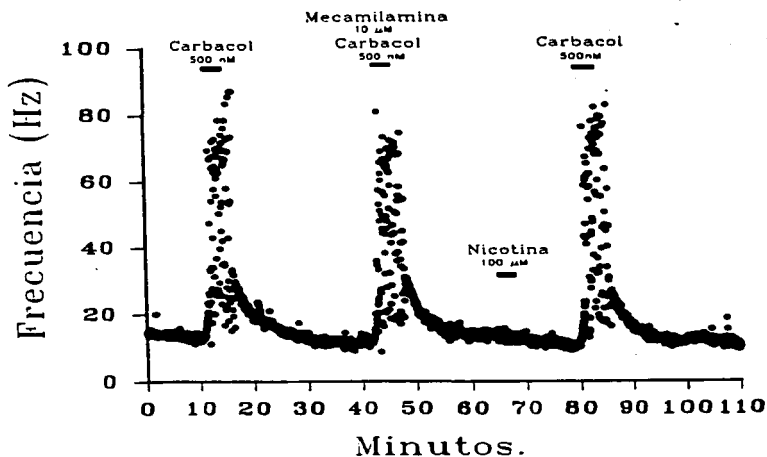


Figura 18. Efecto de la mecamilamina y la nicotina. La frecuencia de disparo de las neuronas del núcleo subtálmico se monitoreó mediante la técnica de registro unitario extracelular en la rebanada sumergida. El carbacol se añadió al medio de baño por un periodo de 3 minutos (barra oscura) a la concentración indicada en la figura. Posteriormente (barras oscuras) se aplicó mecamilamina + carbacol, nicotina sola y carbacol solo, a las concentraciones indicadas. La figura representa un registro único.

VIII.- DISCUSION.

A) Actividad Electromiográfica.

1.- Las ratas tratadas con reserpina o haloperidol: un modelo de síndrome parkinsonico adecuado para el estudio de los fármacos anticolinérgicos.

La reserpina o el haloperidol, administrado a dosis altas, puede inducir en la rata un síndrome caracterizado por una disminución en la actividad locomotora y un importante aumento en el tono muscular que se asemeja a la acinesia y la rigidez muscular observadas en el parkinsonismo medicamentoso (de los pacientes que reciben neurolépticos) o en la enfermedad de Parkinson. Este modelo ha sido ampliamente utilizado para el estudio de las drogas antiparkinsonicas (anticolinérgicos o L-dopa) y de los mecanismos fisiopatológicos que provocan la rigidez muscular (Roos y Steg., 1964; Goldstein y cols, 1975; Johnels y cols., 1978; Klockgether y Turski, 1990; Klockgether y cols., 1991; Double y Crocker, 1993). Actualmente se sabe que el efecto de la reserpina es a nivel presináptico, disminuyendo la concentración de catecolaminas en el SNC, mientras que el efecto del haloperidol es a nivel postsináptico, bloqueando los receptores para la dopamina.

Recientemente, se ha reportado que la administración sistémica de reserpina (5 mg/kg/i.p.) o de haloperidol (3 mg/Kg/i.p.), provoca en la rata un incremento de la actividad electromiográfica en el musculo *gastrocnemius-soleous*, aproximadamente a los 90 minutos de su aplicación, manteniendose este efecto por más de ocho horas (Klockgether y Turski,

1990; Klockgether y cols., 1991; Double y Crocker, 1993), lo cual indica que este modelo es viable para el estudio de la rigidez muscular. En este estudio, se observó un marcado decremento de la actividad locomotora a las dos horas de su aplicación y se registro un incremento del tono muscular a las tres horas de su aplicación.

2.- El bloqueo de los receptores muscarínicos M_1 o M_3 , disminuye la rigidez muscular en la rata parkinsoniana.

La aplicación directa de pirenzepina (1 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$) o de 4-DAMP (0.25 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$) en el núcleo subtálmico redujó significativamente la actividad electromiográfica, inducida por el bloqueo en la transmisión dopaminérgica, del músculo *gastrocnemius-soleous*, mientras que el AF-DX 116 no tuvo efecto (ver figura XX). Mis resultados sugieren que la rigidez muscular observada en los animales parkinsonicos podría estar mediada por una activación de receptores muscarínicos que farmacológicamente pertenecen al subtipo M_1 o M_3 , a nivel del núcleo subtálmico.

B) Registro unitario extracelular in vitro.

1.- El carbacol indujo un efecto excitatorio sobre las neuronas subtálámicas.

El carbacol, el cual se le conoce un efecto como agonista colinérgico sobre los receptores tanto muscarínicos como nicotínicos, produjo un incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas del núcleo subtálamico (figuras 11 y 13). Este resultado concuerda con lo reportado por Féger y cols (1979), quienes reportaron que la acetilcolina, incrementa la frecuencia de disparo de estas neuronas.

Mis resultados muestran además que la plicación sostenida de carbacol (15 minutos) no provoca desensibilización de receptores, ya que la excitación se mantuvo durante todo el período de administración (figura 13). Además, este efecto es dosis-dependiente (figura 12), con una IC_{50} para carbacol de 500 nM, dosis que esta dentro de rango fisiológico y además hay que resaltar que esta dosis es 10 veces menor que la reportada para carbacol en las neuronas del caudoputamen (Bargas y col, 1994).

Estos resultados refuezan la idea de que la acetilcolina ejerce un efecto excitatorio a nivel del núcleo subtálamico y sugieren además que la liberación sostenida de acetilcolina en este núcleo podría causar un estado de hiperexcitabilidad de estas neuronas, lo que podría estar relacionado con la aparición de la acinesia y la rigidez muscular del paciente parkinsoniano.

2.- Los antagonistas muscarínicos M_1 , pirenzepina y trihexifenidil, bloquearon la excitabilidad inducida por carbacol sobre las neuronas subtálamico.

La figura 14 muestra que el incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas del núcleo subtálamico, inducido por carbacol fue completamente bloqueado por los antagonistas muscarínicos M_1 , pirenzepina y trihexifenidil (Artane). Este último fármaco se utiliza en la clínica con buenos resultados para tratar la rigidez muscular y la acatisia del paciente con parkinsonismo.

Hay que resaltar, que fue necesario usar dosis altas ($5\mu\text{M}$) de estos fármacos anticolinérgicos, para bloquear completamente el efecto del carbacol (500 nM). Se sabe que la afinidad de estos antagonistas por su receptor es alta (Lacey y cols, 1990), lo que significa, que con dosis que estuvieran en el rango nanomolar, se lograría el bloqueo total de la respuesta a carbacol.

Con base en lo anterior, nuestros resultados sugieren, que el receptor involucrado en el efecto del carbacol es uno diferente al subtipo M_1 .

3.- El antagonista muscarínico M_3 , 4-DAMP, a una concentración nanomolar, bloquea totalmente el efecto del carbacol sobre las neuronas del núcleo subtálamico.

El antagonista muscarínico M_3 , 4-DAMP también bloquea totalmente el incremento de la frecuencia de disparo de las neuronas del núcleo subtálamico inducido por carbacol (500 nM) (figura 16). Además, la dosis adecuada para bloquear el efecto de carbacol fue de 200 nM , es decir, una dosis 25 veces menor que la utilizada con los antagonistas M_1 .

Por otro lado, este resultado concuerda con lo reportado por Weiner y colaboradores

(1990), quienes demostraron mediante estudios de hibridización *in situ* que las neuronas del núcleo subtálamico contienen el mRNA que expresa receptores del subtipo M₃.

Todo lo anterior sugiere, que el efecto observado con los antagonistas M₁, se puede deber a un efecto inespecifico que podría presentarse al usar dosis altas de estos fármacos, lo cual estaría asociado con una baja selectividad de los antagonistas muscarínicos (Hulme y cols., 1990).

El hecho de que altas dosis del antagonista M₂, AF-DX 116 (10 µM) (figura 15) no bloquearan el efecto de carbacol, descarta la posibilidad de que este efecto sea mediado por este subtipo de receptores en las neuronas del núcleo subtálamico. Además como se observa claramente en la figura 17, la IC₅₀ para el 4-DAMP fue 17 veces menor que para pirenzepina y 67 veces menor que para AF-DX 116, lo cual reafirma que el receptor involucrado en el bloqueo del efecto de carbacol puede ser del subtipo M₃.

Finalmente, nuestros resultados indican entonces, que el receptor a través del cual se ejerce el efecto de la acetil colina en el núcleo subtálamico es del tipo M₃, el que esta acoplado al metabolismo del fosfatidil inositol, al igual que los subtipos M₁ y M₂ (Peralta y cols, 1988; Wess y cols. 1989; Ashkenazi y cols., 1989).

4.- El antagonista nicotínico, Mecamilamina, no bloqueo el efecto del carbacol.

Reciente ha sido mostrado la presencia de baja densidad de sitios de unión a la (³H)-nicotina en las neuronas del núcleo subtálamico de humanos. Además, de que el carbacol tiene acción tanto nicotínica como muscarínica. Por esta razón se investigó el efecto de los antagonistas

nicotínicos. Nuestros resultados descartan que el efecto de carbacol en estas neuronas, sea mediado por un receptor nicotínico, ya que la mecamilanina a altas dosis, un antagonista de estos receptores, no bloqueó el efecto del carbacol sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del núcleo subtálmico (figura 18). En concordancia con este hecho, la nicotina empleada a dosis alta, careció de efecto (figura 18).

Estos datos están de acuerdo con los reportados por Féger y cols (1979), quienes reportaron que el efecto excitatorio de la acetilcolina, aplicada iontoforéticamente en el núcleo subtálmico de la rata anestesiada, se bloqueo con antagonistas muscarínicos, pero no con mecamelanina.

5.- Papel fisiológico de la inervación colinérgica del núcleo subtálmico.

Tradicionalmente se ha supuesto que la acción benéfica de los fármacos anticolinérgicos, que se utilizan en el tratamiento del parkinsonismo medicamentosos o bien de la enfermedad de Parkinson, se debe a su acción a nivel del caudo-putamen. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el núcleo subtálmico podría ser también uno de los sitios de acción de estos medicamentos. Además, estos datos permiten sugerir que la entrada colinérgica excitatoria al núcleo subtálmico es responsable, al menos en parte, de la rigidez muscular observada en el parkinsonismo medicamentoso en este modelo animal.

Por otra parte, se sabe que los anticolinérgicos que se utilizan en la actualmente en la clínica para el manejo de los síntomas parkinsonicos (trihexifenidil y biperiden) bloquean

receptores muscarínicos M_1 , y además como Burke y Fahn (1985) han indicado se requiere usar dosis muy altas de estos fármacos, para reducir los síntomas de los pacientes parkinsonianos, por lo cual, se ha llegado a especular que el efecto benéfico de estos fármacos podría deberse a un bloqueo de los receptores NMDA (Greenamyre y cols. 1991), ya que a dosis altas se ha reportado que las drogas anticolinérgicas, tales como trihexifenidil (Artane), la etopropazina (Parsidol), la prociclidina (Kemadrin) y Biperiden (Akineton) tienen efectos como antagonistas no competitivos del receptor NMDA, posiblemente a nivel del canal iónico (Olney y cols., 1987). Pero nuestros resultados están en contra de estas especulaciones y demuestran que el 4-DAMP, un antagonista muscarínico M_3 , bloquea de manera más eficaz el efecto excitatorio del carbacol sobre las neuronas del núcleo subtálamico, que los antagonistas muscarínicos M_1 . Esto permite sugerir que la acción colinérgica en dicho núcleo se ejerce a través de la activación de un receptor muscarínico del subtipo M_3 . Además, si suponemos que esto es cierto en el humano, entonces es posible que el empleo de un medicamento que bloquee de manera más selectiva los receptores muscarínicos M_3 , podría dar mejores resultados en el control de los síntomas del parkinsonismo medicamentoso o de la enfermedad de Parkinson con una dosis más baja y con menos efectos colaterales.

IX.- CONCLUSIONES.

Estos resultados permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- a) La aplicación directa de antagonistas muscarínicos de los subtipos M_1 o M_3 en el núcleo subtálamico reduce la rigidez muscular en la rata parkinsoniana.**

- b) En este modelo animal de parkinsonismo, la rigidez muscular es provocada, al menos en parte, por un incremento de la neurotransmisión colinérgica al núcleo subtálamico.**

- c) La activación de los receptores colinérgicos, mediante el carbacol (agonista colinérgico), a nivel del núcleo subtálamico causó un incremento de la frecuencia de disparo de las neuronas de este núcleo.**

- d) El efecto del carbacol a nivel del núcleo subtálamico es a través de la activación de receptores muscarínicos M_3 .**

- e) El efecto benéfico de los fármacos anticolinérgicos, podría ser en parte a nivel del núcleo subtálamico, bloqueando receptores muscarínicos M_3 .**

- f) Debe investigarse el efecto de dosis bajas de antagonistas muscarínicos M_3 , en el control de los síntomas del paciente con parkinsonismo.**

X.- REFERENCIAS

Aceves, J., Floran, B., Martínez-Fong, D., Benitez, J, Sierra, A. and Flores, G., Activation of D₂ receptors stimulates accumulation of τ -aminobutyric acid in slices of the pars reticulata of 6-hydroxydopamine-lesioned rats, *Neurosci. Lett.*, 145 (1992) 40-42.

Adams, R., *Principles of Neurology*. New York, McGraw-Hill Book Co., (1981). pp. 1390.

Aghajanian, G. K. and Ramussen, K., Intracellular studies in the facial nucleus illustrating a simple new method for obtaining viable motoneurons in adult rat brain slices, *Synapse.*, 3 (1989) 331-338.

Albin, R.L., Aldridge, J.W., Young, A.B. and Gilman, S., Feline subthalamic nucleus neurons contain glutamate-like but not GABA-like or glycine-like immunoreactivity, *Brain Res.*, 491 (1989a) 185-188.

Albin, R.L., Young, A.B. and Penney, J.B., The functional anatomy of basal ganglia disorders, *TINS*, 12 (1989b) 366-375.

Alexander G.E. and Crutcher M.D., Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing, *TINS*, 13 (1990) 266-271.

Arcadi, J. *Diseases of the nervous system in childhood*. Oxford, Blackwell Scientific publications Ltd, second edition, (1992) pp. 1408.

Armstrong, D.M., Saper, C.B., Levey, A.I., Wainer, B.H. and Terry, R.D., Distribution of cholinergic neurons in the rat brain demonstrated by immunocytochemical localization of choline acetyltransferase, *J. Comp. Neurol.* 216 (1983) 53-68.

Anderson, P.H. and Yoshida, M., Electrophysiological evidence for branching nigral projections to the thalamus and the superior colliculus, *Brain Res.*, 137 (1977) 361-364.

Ashkenazi, A., Peralta, E.G., Winslow, J.W., Ramachandran, J. and Capon, D.J., Functionally distinct G-proteins selectively couple different receptors to PI hydrolysis in the same cell. *Cell*, 56 (1989) 487-493.

Bergman, H., Wichmann, T. and DeLong M., Reversal of experimental Parkinsonism

- lesions of the subthalamic nucleus, *Science*, 249 (1990) 1436-1438.
- Berne, M.R. and Levy, N.M., The basal ganglia. In *Physiology*, chapter 17, second edition, Mosby, (1988) 238-243.
- Booner, T.I., Buckley, N.J., Young, A.C. and Brann, M.R. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptors genes, *Science* 237 (1978) 527-532.
- Brooks B. V. (1986). The basal ganglia. In *The neural basis of motor control*. Chapter 14. Oxford University Press, pp. 290-315.
- Burke, R.E. and Fahn, S., Pharmacokinetics of trihexyphenidil after short-term and long-term administration to dystonic patients, *Ann Neurol*. 18 (1985) 35-40.
- Burke, R.E., The relative selectivity of anticholinergic drugs for the M₁ and M₂ muscarinic subtypes, *Mov. Disord*, 1 (1986) 135-144.
- Carpenter M.B., Whitter J.R. and Mettler F. A., Analysis of choreoid hyperkinesia in the rhesus monkey. Surgical and pharmacological analysis of hyperkinesia resulting from lesions in the subthalamic nucleus of Luys, *J. Comp. Neurol.*, 92 (1950) 293-332.
- Carpenter M. B., Carleton S. C., Keller J. T. and Conté P., Connections of the subthalamic nucleus in the monkey, *Brain Res.*, 224 (1981) 1-29.
- Carpenter, M. B. and Jayaraman, A., Subthalamic nucleus of the monkey's connections and immunocytochemical features of afferents, *J. Hirnforsch*, 31 (1990) 653-668.
- Crossman A.R., Sambrook M.A. and Jackson A., Experimental hemichorea/hemiballismus in the monkey, *Brain*, 107 (1984) 579-576.
- DeLong M.R., Primate model of movement disorders of basal ganglia origin, *TINS*, 13 (1990) 281-285.
- Double, K. L. and Crocker, A.D. Quantitative electromyographic changes following modification of central dopaminergic transmission. *Brain Res.* 604 (1993) 342-344.
- Dray A., Davies J. Oakley N. R. and Vellucci S. The Dorsal and Medial Raphe projections to the Substantia Nigra in the rat: Electrophysiological, Biochemical and Behavioral observations. *Brain Res.*, 151 (1978) 431-442.

Dray A. Serotonin in the basal ganglia: functions and interactions with other neuronal pathways. *J. Physiol. (Paris)*, 77 (1981) 393-403.

Ehringer, H. and Hornykiewicz, O., Verteilung von noradrenalin und dopamin (3-hydroxytyramin) in gehirn des menschen und ihr verhalten bei erkrankungen des extrapyramidalen systems, *Wein. Klin. Wschr.*, 38 (1960) 1236-1239.

Fallon H. J. and Loughlin E. S., Substantia nigra. In *The rat nervous system*. vol. 1, ed. G. Paxinos (Academic Press Australia), (1985) p. 353-374.

Féger J., Hammond C. and Rouzaire-Dubois B., Pharmacological properties of acetylcholine-induced excitation of subthalamic nucleus neurones, *Br. J. Pharmacol.*, 65 (1979) 511-515.

Féger, J., Robledo, P. and Renwart, N., The subthalamic nucleus: new data, new questions. In : Carpenter, B. and Jayaraman, A., eds., *The Basal Ganglia*, vol II, New York, Plenum Press, (1992), 99-107.

Flores, G., Valencia, J., Rosales, G. M. Sierra, A. and Aceves, J., Appearance of EMG activity and motor asymmetry after unilateral lesions of the dopaminergic innervation to the subthalamic nucleus in the rat, *Neuroscience Letters*, 162 (1993) 153-156.,

García-Rill, R. and Skinner, R.D., The basal ganglia and the mesencephalic locomotor region. In *Neurobiology of Vertebrate Locomotion*. The Macmillan Press: England, (1987).

Goldman-Rakic P.S. and Selemon, L.D., New frontiers in basal ganglia research, *TINS*, 13 (1990) 241-244..

Goldstein, J. M., Barnett, A. and Malick, J.B., The evaluation of anti-parkinson drugs on reserpine-induced rigidity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 33 (1975) 183-188.

Greenamyre, J. T. Glutamate-dopamine interactions in the basal ganglia: relationship to Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 48 (1991) 977-981.

Hammond C., Féger J., Bioulac B. and Souteyrand J. P., Experimental hemiballism in the monkey produced by unilateral kainic acid lesion in corpus Luysii, *Brain Res.*, 171 (1979) 577-580.

Hammond C., Rouzaire-Dubois, B., Féger J., Jackson, A and Crossman, A. R.

Anatomical and electrophysiological studies on the reciprocal projections between the subthalamic nucleus and nucleus tegmenti pedunculopontine in the rat, *Neuroscience*, 9 (1983) 41-52.

Hulme, E. C., Birsdall, N. J. M. and Bucklery, N. J. Muscarinic receptor subtypes, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30 (1990) 633-673.

Jackson, A. and Crossman, A. R., Nucleus tegmenti pedunculopontinus: efferent connections with special reference to the basal ganglia, studied in the rat by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase, *Neuroscience*, 10 (1983) 725-765.

Johnels, B., Steg, G and Ungerstedt, U., A method for mecanographical recording of muscle tone in the rat: the effect of some antiparkinsonian drugs on rigidity induced by reserpine, *Brain Res.*, 140 (1978) 177-181.

Kilpatrick C. L., Starr S. M. Fletcher A., James A. T. and Macleod K. N., Evidence for a GABAergic nigrothalamic pathway in the rat. I. Behavioral and biochemical studies. *Exp. Brain Res.*, 40 (1980) 45-54.

Kitai S.T. and Kita H., Anatomy and physiology of the subthalamic nucleus: a driving force of the basal ganglia, In: Carpenter, B. and Jayaraman, A., eds., *The Basal Ganglia, vol II*, New York, Plenum Press, 1987, 357-373.

Klockgether, T. and Turski, L., NMDA antagonists potentiated antiparkinsonian actions of L-dopa in monoamine-depleted rats, *Ann. Neurol.*, 28 (1990) 539-546.

Klockgether, T., Turski, L., Honoré, T., Zhang, Z., Gash, M., Kurlan, R. and Greenamyre, T., The AMPA receptor antagonist NBQX has antiparkinsonian effects in monoamine-depleted rats and MPTP-treated monkeys, *Ann. Neurol.*, 30 (1991) 717-723.

Klawans, H.L., Moses, H., Nausieda, P.A., Bergen, D. and Weiner, W.J., Treatment and prognosis of hemiballismus, *New England J. Med.*, 295 (1976) 1348-1350.

Kobayashi, R. M., Brownstein, M., Saavedra, J.M. and Palkovit, M., Choline acetyltransferase content in discrete regions of the rat brainstem, *J. Neurochem.* 24 (1975) 637-640.

Lacey, M. G., Calabrasi, P. and North, R. A., Muscarine depolarizes rat substantia nigra zona compacta and ventraltegmental neurons in vitro through M₁-like receptors, *J.*

Pharmacol. Exp Ther. 253 (1990) 395-400.

Lea-Plaza, H. and Uiberall, E., Hemibalismus, *Rev. Med. Chil.*, 73 (1945) 938.

Lindvall, O., Transplantation into the human brain: present status and future possibilities, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. (Spec. Suppl.)*, (1989) 39-54.

McGeer, P. L. and McGeer, E. G., Enzymes associated with the metabolism of catecholamines, acetylcholine and GABA in human controls and patients with parkinson's disease and huntington's chorea, *J. of Neurochem.* 26 (1976) 65-76.

Marsden, C.D. and Parkes, J.D., Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease, *Lancet*, i (1977) 345-349.

Meibach R.C. and Katzman R., Catecholaminergic innervation of the subthalamic nucleus: evidence for a rostral continuation of the A9 (substantia nigra) dopaminergic cell group, *Brain Res.*, 173 (1979) 364-368.

Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H. and Levey, A. L., General cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature, *Neuroscience*, 10 (1983) 1185-1201.

Mesulam, M. M., Mash, D., Hersh, L. And Geula, C., Cholinergic innervation of the human striatum, globus pallidus, subthalamic nucleus, substantia nigra, and red nucleus, *J. Comp. Neurol.* 323 (1992) 252-268.

Mintz, I., Hammond, C. and Féger, J, Excitatory effect of iontophoretically applied dopamine on identified neurons of the rat subthalamic nucleus, *Brain Res.*, 375 (1986) 172-175.

Moon-Edley, E. S. and Graybiel, A. M., Connections of the nucleus tegmenti pedunculopontinus, pars compacta (TPc) in cat, *Anat. Rec.* 196 (1980) 129A.

Motles E., Infante C., Leiva J., Saavedra H. and Martinez I, Output pathway for turning behavior from the neostriatum and substantia nigra in cats. *Brain Res.*, 473 (1988) 65-73.

Nakanishi, H., Kita, H. and Kitai, S. T., Intracellular study of rat substantia nigra pars reticulata neurons in an *in vitro* preparation: electrical membrane properties and response characteristics to subthalamic stimulation, *Brain Res.*, 437 (1987) 45-55.

Nauta, W. J. and Cole, M., Efferent projections of the subthalamic nucleus: An

- autoradiographic study in the monkey and cat. *J. Comp. Neurol.*, 180 (1979) 1-16.
- Nieoullon, A. and Dusticier, N., Choline acetyltransferase activity in discrete regions of the cat brain, *Brain Res.*, 196 (1980) 139-149.
- Noback C and Demarest R. El cerebro: Anatomía macroscópica e irrigación sanguínea. Meninges. En *Sistema Nervioso Humano*. Fundamentos de neurobiología. McGraw-Hill. (1975) pp. 1-32.
- Nomura, S., Mizuno, N. and Sugimoto, T. Direct projections from the pedunculopontine tegmental nucleus to the subthalamic nucleus in the cat, *Brain Res.*, 196 (1980) 223-227.
- Olney, J. W., Price, M. T. and Labryere, J., Anti-parkinsonian agents are phencyclidine agonists and N-methyl-D-aspartate antagonists, *Eur. J. Pharmacol.* 142 (1987) 319-320.
- Parent A., Mackey A. and Bellefeuille L., The subcortical afferents to caudate nucleus and putamen in primates: a fluorescence retrograde double labeling study, *Neuroscience*, 10 (4) (1983) 1137-1150.
- Parent, A. and Smith, Y., Organization efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as revealed by retrograde labeling methods, *Brain Res.*, 436 (1987) 296-310.
- Paxinos G. and Watson C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd edn., Academic Press, New York; 1988.
- Peralta, E. G., Ashkenazi, A., Winslow, J. W., Ramachandran, J. and Capon, D. J., Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptors subtypes, *Nature*, 334 (1988) 434-437.
- Perkins, M. N. and Stone, T. W., Subthalamic projection to the globus pallidus: an electrophysiological study in the rat, *Exp. Neurol.*, 68 (1980) 500-511.
- Pickel V. and Chan J., Spiny neurons lacking choline acetyltransferase immunoreactivity are major targets of cholinergic and catecholaminergic terminals in rat striatum, *J. Neurosci. Res.*, 25 (1990) 263-280.
- Pycock, C.J. and Kilpatrick I.C., Motor asymmetries and drug effects. Behavioral analyses of receptor activation, in *Neuromethods, Psychopharmacology*, 13 (1989) 1-93.

Rafols, J. A. and Fox, C. A., The neurons in the primate subthalamic nucleus: a Golgi and electron microscopic study, *J. Comp. Neurol.*, 168 (1976) 75-112.

Romansky, K.V., Usunoff, K.G., Ivanov, D.P. and Galabov, G.P., Corticosubthalamic projection in the cat: an electron microscopic study, *Brain Res.*, 163 (1979) 319-322.

Roos, B. E. and Steg, G., The effect of L-3,4-dihydroxyphenylalanina and DL-5-hydroxytryptophan on rigidity and tremor induced by reserpine, chlorpromazine and phenoxybenzamine, *Life Sci.*, 3 (1964) 351-360.

Rosales, M. G., Flores, G., Hernández S., Martínez-Fong, D. and Aceves, J., Activation of subthalamic neurons produces NMDA receptor-mediated dendritic dopamine release in substantia nigra pars reticulata: a microdialysis study in the rat, *Brain Res.*, 645 (1994) 335-337.

Rouzaire-Dubois, B., Hammond, C., Hamon, B. and Féger, J., Pharmacological blockade of the globus pallidus-induced inhibitory responses of the subthalamic cells in the rat, *Brain Res.*, 200 (1980) 321-329.

Rouzaire-Dubois, B., and Scarnati, E., Pharmacological study of the cortical-induced excitation of subthalamic nucleus neurons in the rat: evidence of amino acids as putative neurotransmitters, *Neuroscience*, 21 (1987) 429-440.

Rye, D. B., Saper, C. B., Lee, H. J. and Wainer, B. H. Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: Cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum, *J. Comp. Neurol.* 259 (1987) 483-528.

Sandyk, R. and Fisher, H., Serotonin in involuntary movement disorders. *Inter. J. Neuroscience*, 42 (1988) 185-205.

Saper, C.B. and Loewy, A.D. Projections of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat: evidence for additional extrapyramidal circuitry, *Brain Res.*, 252 (1982) 367-372.

Satoh, K., Armstrong, D. M. and Fibiger, H. C. A comparison of the distribution of central cholinergic neurons as demonstrated by acetylcholinesterase pharmacohistochemistry and choline acetyltransferase immunohistochemistry, *Brain Res. Bull.* 11 (19983) 693-720.

Scheel-Kruger J., Dopamine-GABA interactions: evidence that GABA transmits, modulates and mediates dopaminergic functions in the basal ganglia and limbic system. *Acta Neurol. Scand.*, 73 (suppl. 107), (1986) 1-54.

Smith, Y., Hazrati, L. N. and Parent, A., Efferent projections of the subthalamic nucleus

in the squirrel monkey as studied by the PHA-L anterograde tracing method, *J. Comp. Neurol.*, 294 (1990) 306-323.

Soto E. and Vega R., A turbo Pascal program for on line spike data analysis using a standard serial port, *J. Neurosci. Methods*, 19 (1987) 61-68.

Sugimoto, T. and Hattori, T. Organization and efferent projections of nucleus tegmenti pedunculopontine pars compacta with special reference to its cholinergic aspects, *Neuroscience*, 11 (1984) 931-946.

Tago, H., McGeer, P. L. McGeer, E. G., Akiyama, H. and Hersh, L. B. Distribution of choline acetyltransferase immunopositive structures in the brainstem, *Brain Res.*, 495 (1989) 271-297.

Takada, M., Nishihama, M. S., Nishihama, C. C. and Hattori, T., Two separate populations of the subthalamic nucleus project to the basal ganglia and to the pedunculo pontine tegmental region. *Brain Res.*, 442 (1988) 72-80.

Van Der Kooy, D. and Hattori, T., Single subthalamic nucleus neurons to both the globus pallidus and substantia nigra in rat, *J. Comp. Neurol.*, 192 (1980) 751-758.

Van Rossum, J.M., The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of the neuroleptic drugs, *Arch. Int. Pharmacol. Ther.*, 160 (1966) 492-494.

Weiner, D. M., Levey, A. I. and Brann, M. R., Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87 (1990) 7050-7054.

Wickens J. Striatal dopamine in motor activation and reward-mediated learning: steps towards a unifying model. *J. Neural. Transm.* 80 (1988) 9-31.

Wess, J., Brann, M. R. and Bonner, T. I. Identification of a small intracellular region of the M₃ receptor responsible for selective coupling to PI turnover. *Trends. Pharmacol. Sci.* 10 (1989) (Suppl. Subtypes of muscarinic receptors IV), p 115.

Wolf, N. J. and Butcher, L.L., Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia and basal forebrain, *Brain Res. Bull.*, 16 (1986) 603-637.

Woolf, N. J. and Butcher, L.L., Cholinergic neurons in the caudate-putamen complex proper are intrinsically organized: a combined Evans blue and acetylcholinesterase analysis, *Brain Res. Bull.*, 7 (1981) 487-507.

Xuereb, J. H. , Perry, E. K., Candy, J. M., Bonham, J. R., Perry, R. H. Marshall, E., Parameters of cholinergic neurotransmission in the thalamus in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 99 (1990) 185-189.

Zigmond M.J., Abercrombie E.D., Berger T.W., Grace A.A. and Stricker E.M., Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications, *TINS*, 13 (1990) 290-296.