

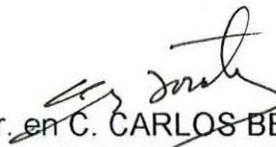
DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS  
COORDINADOR DEL POSGRADO  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de tesis realizado por la **Biol. Veronica Chaparro Huerta**, con el título: "**CARACTERIZACION DE LA LIBERACION DE DOPAMINA Y SU REGULACION POR LA ACTIVACION DEL RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA) EN SINAPTOSOMAS ESTRIATALES**", consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su disposición el escrito final para autorización de impresión y programación de fecha de examen de grado.

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

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., a 21 de Abril de 1999.

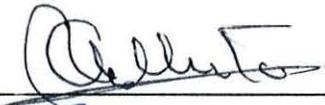
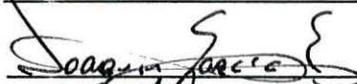
  
Dr. en C. CARLOS BEAS ZÁRATE  
DIRECTOR DE TESIS

DR. EN C. ALBERTO MORALES VILLAGRAN

DR. EN C. FERANDO ALFARO BUSTAMANTE

DR. EN C. JOAQUIN GARCIA ESTRADA

DR. EN C. JACINTO BAÑUELOS PINEDA


Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neuroquímica de la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. en C. Carlos Beas Zárate.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por todo su amor, apoyo y cariño que me brindaron para seguir adelante.

Al Dr. en C. Carlos Beas Zárate por su tutoría en la realización del trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Consuelo, Liz, Mayra, Gris, Lety y Monica, por su apoyo, paciencia, amistad y conocimientos que me brindaron para superarme.

A mis compañeros más recientes Martha, Rocío, César, Mario y Víctor, por su amistad y alientos para terminar mi tesis.

A tí, el hombre casi perfecto, que ha dedicado parte de su vida a compartirme lo que sabe, dándole vida a mí vida.

## **A MIS PADRES**

Que me dieron la vida,  
la fortaleza y apoyo en  
los momentos más difíciles.  
Por brindarme el deseo  
de superarme y seguir adelante.

## **A TI**

Porque dejaste tú huella  
en mi pensamiento y corazón,  
donde estará por siempre,  
decidida a continuar  
y en el tiempo a perdurar.

## INDICE

Lista de abreviaturas .....	i
Resumen .....	iii
Abstract .....	iv
Introducción .....	1
Antecedentes .....	8
Planteamiento del Problema .....	13
Hipótesis .....	15
Objetivos .....	17
Diagrama experimental .....	19
Material y Métodos .....	21
Resultados .....	25
Discusión .....	32
Conclusiones .....	36
Figuras y Tablas .....	38
Bibliografía .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAE	Amino ácido excitador
DTNB	Acido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico
AMPA	Acido propiónico 3-amino-4-hidroxi-5-metil-isoxasol
ARC	Arcaína
ARG	L-arginina
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
Ca <sup>++</sup>	Ión Calcio
CA	Catecolaminas
CNQX	6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DTT	Ditiotreitol
DA	Dopamina
DAérgica	Dopaminérgica
GABAérgica	Gabaérgica
GAMS	Acido D-gamma-glutamilaminometanosulfónico
Glu	Glutamato
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
<sup>3</sup> H	Tritio
K <sup>+</sup>	Ión Potasio
KA	Kainato
KCl	Cloruro de Potasio
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
mCi	Milicurie
min	Minuto
Mg <sup>++</sup>	Ión Magnesio
mg	Miligramo
MK-801	Dizocilpina

$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
ml	Mililitro
mM	Milimolar
$\text{Na}^+$	Ión Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
$\text{NaHCO}_3$	Bicarbonato de Sodio
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Fosfato de Sodio Dibásico
Ni-Arg	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
NMDA	N-metil-D-aspartato
ON	Oxido Nítrico
ONS	Oxido Nítrico Sintasa
PCP	Fenciclidina
PLT	Potencial de Largo Término
QUIS	Quiscualato
R-AMPA	Receptor a AMPA
R-Glu	Receptor a Glu
R-KA	Receptor a Kainato
R-NMDA	Receptor a NMDA
-SH	Grupos sulfhidrilo
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SPD	Espermidina
SPM	Espermina
$\text{Zn}^{++}$	Ión Zinc

## RESUMEN

En los últimos años ha sido de gran interés el estudio de la interacción de los sistemas Dopaminérgico y Glutamatérgico, dada su implicación en diferentes procesos patológicos de algunas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo se desconoce la implicación que podría tener la formación de óxido nítrico (ON) por activación de receptores a glutamato (R-Glu) sobre el cuerpo estriado en la regulación de la liberación de dopamina (DA), así como la posible participación del sitio a poliaminas (PA) y de óxido-reducción del receptor N-metil-D-Aspartato (R-NMDA) por lo que el objetivo del trabajo fue establecer la participación de los sitios específicos del receptor sobre la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica. Se utilizaron ratas macho wistar, adultas de las que se obtuvo el cuerpo estriado para la preparación de sinaptosomas, estos fueron sometidos a experimentos de liberación espontánea de DA-[<sup>3</sup>H], en presencia y ausencia de agonistas a Glu como el NMDA, Kainato y Quiscualato y de los antagonistas MK-801, GAMS y CNQX respectivamente. También del precursor de la producción de ON (L-Arginina) y del inhibidor de la síntesis del mismo (Nitro-Arginina), así como de agentes que modulan el sitio a PA y el sitio redox. Los resultados muestran que los agonistas del R-Glu, la L-Arginina, la espermidina (SPD) y el agente reductor ditioneitol (DTT) inducen un incremento en forma diferencial sobre la liberación espontánea de DA-[<sup>3</sup>H]. Por otro lado, la presencia de los respectivos antagonistas en forma independiente y en combinación con el agonista inhiben la liberación espontánea de DA. La L-Arg, la SPD y el NMDA juntos (10µM), tiene un efecto estimulador de mayor intensidad que en forma independiente, sin llegar a ser aditivo en la liberación de DA. La aplicación de Nitro-Arg, arcaína y MK-801 (10µM) revierten el efecto de manera significativa la liberación de DA respecto a los agentes estimuladores. Por lo que los resultados indican que la activación de los diferentes tipos de receptores ionotrópicos para Glu (NMDA, KA, QUIS), en particular la producción de ON y los sitios moduladores a PA y redox del R-NMDA tienen un efecto excitador importante sobre la liberación de DA, lo que sugiere una forma de modular la liberación en el cuerpo estriado, ya que en la presencia de los inhibidores respectivos reduce dicho efecto.

## ABSTRACT

On last years the interaction between Dopaminergic and Glutamatergic systems has been of great interest for their implications in different neurodegeneratives diseases. However, the role that could play the nitric oxide (NO), polyamines and redox sites of glutamate receptors on dopamine (DA) release regulation at the striatum is unknown. Thus, the purpose of this study was designed to establish the role of glutamate receptor, mainly N-methyl-D-aspartate type on the dopaminergic neurotransmission. Male adults Wistar rats were decapitated and synaptosomal fraction was prepared from striatum. Spontaneous [3H]-DA release in presence and in absence of glutamate agonist, like NMDA, kainate and quisqualate, as well as, the respective antagonists MK-801, GAMS and CNQX were measured on that fractions. Furthermore, [3H]-DA release also was evaluated in presence of L-arginine and Nitro-arginine, spermidine agent that modulate polyamines site, DTT and DTNB agents that modulate redox site. Results showed that glutamate receptor agonists, L-arginine, spermidine and DTT reductor agent, induced an important increase on spontaneous [3H]-DA release. The presence of antagonists respective to glutamate receptors, alone or combined with its agonists inhibited that spontaneous [3H]-DA release. L-arginine, spermidine and NMDA (10  $\mu$ M), had an additive stimulatory effect on [3H]-DA release. The application of nitro-arginine, arcaine and MK-801 (10  $\mu$ M) significantly reverted the effect on [3H]-DA release compared with its respective stimulators agents. Thus, the results showed that the activation of ionotropic glutamate receptors mainly NMDA type, posses an important excitatory effect on [3H]-DA release in the striatum, which appear to be mediated through polyamines and redox modulatory sites, as well as, the nitric oxide produced by stimulation of the NMDA receptors. This suggest the existence of an important mechanism to regulate the [3H]-DA release which could be dependent of the NMDA receptor activity and the nitric oxide production with an important role in this mechanism at the striatum.

# **INTRODUCCION**

El cerebro se encuentra dividido por una cisura longitudinal profunda en dos porciones simétricas denominadas hemisferios cerebrales. Ambos hemisferios incluyen estructuras telencefálicas como la corteza cerebral, la sustancia blanca profunda, los núcleos basales y el cuerpo calloso **(1,2)**.

Los núcleos basales comprenden al claustrum, núcleo lenticular, núcleo amigdalino y núcleo caudado, los tres últimos conforman al cuerpo estriado **(2)** (Fig. 1).

El papel más importante del cuerpo estriado es actuar como eslabón del procesamiento de información entre la memoria y el manejo de la experiencia sensorial **(1,2)**. Interviene en la regulación del tono muscular y la postura, en la estabilización y coordinación del movimiento y es base importante de los procesos de aprendizaje **(3)**.

#### Vías dopaminérgicas (DAérgicas)

Los cuerpos celulares de la porción compacta de la sustancia negra y de la región dorsal al núcleo interpeduncular, tiene concentraciones altas de dopamina (DA). Los axones que se originan en la zona compacta ascienden a través del globo pálido y de la cápsula interna hacia el neostriado. Este sistema negroestriado DAérgico se integra a los circuitos de los ganglios basales.

Algunas fibras DAérgicas de la sustancia negra terminan en el cuerpo amigdaloido. Las fibras que se originan en las células dorsales al núcleo interpeduncular ascienden en el tracto medial del cerebro anterior y terminan en el hipotálamo, en el cuerpo amigdaloido y en otras porciones del lóbulo límbico. Algunas neuronas DAérgicas se proyectan a la hipófisis **(2,3)**. En el cerebro medio, se localizan en el área ventral, en la sustancia negra *pars compacta*, *pars reticulata* y en el área retrorrubral, donde proporcionan retroalimentación al estriado y a la corteza prefrontal **(4)**.

El estriado esta también modulado por las interneuronas de tipo GABAérgico y colinérgico, estas últimas ocupan del 1 al 2 % de la población neuronal del estriado

(4).

Además, algunos complejos de fibras GABAérgicas se proyectan hacia otras áreas cerebrales, dentro de las cuales destaca el tálamo, que recibe la mayor proyección GABAérgica del estriado (5).

#### Conexiones eferentes del estriado

La mayor proyección eferente del estriado es hacia el globo pálido, el cual recibe fibras internucleares del caudado y putamen, denominadas **estriato-palidales (4,5,6)**. Además, se han descrito proyecciones **estriato-talámicas** y **estriato-negrales (3)** (Fig.2).

Un primer nivel de compartimentalización funcional en el estriado esta dado por la separación de poblaciones de neuronas estriatales que proyectan al globo pálido y a la sustancia negra (7).

#### Conexiones aferentes al estriado

Existen fibras que se originan de todas las regiones corticales y que se proyectan al estriado, denominadas **conexiones cortico-estriatales**, las cuales utilizan al aminoácido excitador (AAE) glutamato (Glu), como neurotransmisor (1,8) (Fig.2). Además, el estriado recibe fibras de los núcleos intralaminares, del centro mediano y dorsomedial del tálamo, que terminan tanto en el caudado como en el putamen, a éstas se les denomina **conexiones talamoestriatales (2,9)** (Fig.2). Por último una de las vías aferentes más importantes al putamen, son fibras que se originan en la *pars compacta* y *reticulata* de la sustancia negra, ascienden al subtálamo y pasan entre las fibras de la cápsula interna y de ahí al caudado y al pálido; denominadas **conexiones negro-estriatales**, las cuales utilizan dopamina (DA) como neurotransmisor (2,10) (Fig.2). Así podemos concluir, que las dos inervaciones aferentes más importantes al cuerpo estriado son la glutamatérgica originada tanto en la corteza como en el tálamo y la dopaminérgica (DAérgica) originada en la sustancia negra.

## NEUROTRANSMISION DOPAMINERGICA

La dopamina (DA) es la catecolamina (CA) cerebral más abundante, se encuentra ampliamente distribuída, en diferentes concentraciones, dependiendo de la región cerebral que se trate. El principal sistema de fibras DAérgicas en el cerebro es el negroestriatal.

La DA total del cerebro se almacena principalmente en los ganglios basales, ocupando un 80%. En el estriado se almacena en una arborización densa de terminales nerviosas finas derivadas de las neuronas que contienen DA de la sustancia negra compacta. Estas estructuras contienen tirosina hidroxilasa, enzima que utiliza tetrahidrobiopterina como cofactor para transformar al aminoácido L-tirosina en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). La L-DOPA se descarboxila por activación de la enzima dopa descarboxilasa para convertirse en DA **(11,12)** (Fig.3).

Cuando una neurona DAérgica recibe un estímulo despolarizante se abren canales iónicos, que permiten la entrada de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y salida de potasio ( $\text{K}^+$ ). La membrana se despolariza y se promueve la apertura de canales para calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) sensibles a voltaje. Los iones  $\text{Ca}^{++}$  entran a la terminal DAérgica siguiendo su gradiente de concentración y activan los mecanismos responsables de la liberación del transmisor DA **(12,13)**. Después de actuar sobre su receptor y completar el proceso de transmisión, el neurotransmisor se remueve del espacio intersináptico por un proceso de recaptura hacia la terminal nerviosa, lo que involucra la acción de transportadores específicos presentes en la membrana presináptica. Los transportadores pueden capturar a la DA, la cual puede ser reutilizada en vesículas de almacenamiento **(14,15)**. Específicamente el transporte de DA a nivel vesicular resulta ser dependiente de ATP y de iones magnesio ( $\text{Mg}^{++}$ ) **(15,16)**. La DA que no es removida del espacio intersináptico por el mecanismo de recaptura, se metaboliza por la enzima monoamino oxidasa (MAO) (Fig.3).

En el estriado se encuentra la mayor concentración de DA **(11)**, y se considera no sólo como precursor de la norepinefrina sino como un transmisor independiente

en el estriado. En la actualidad existen evidencias claras de que la DA es un transmisor inhibitorio de las células de la sustancia negra cuyas proyecciones innervan el estriado **(17)**.

Debido a sus propiedades farmacológicas y bioquímicas, se han identificado 2 subtipos de receptores a DA. La familia de receptores  $D_1$  y  $D_5$ , que están acoplados a la activación de la adenilato ciclasa y la familia  $D_2$ ,  $D_3$  y  $D_4$  inactivan a ésta enzima. Los  $R-D_1$  son abundantes en estriado, amígdala, tálamo, hipotálamo; los  $D_2$  en estriado, hipotálamo e hipocampo. En comparación el receptor  $D_3$  es común en el tubérculo olfatorio, hipotálamo, estriado y sustancia negra, mientras que el receptor  $D_4$  lo es en la amígdala, corteza frontal, estriado e hipocampo **(18-20)**. Por último el  $D_5$  se localiza sólo en hipocampo e hipotálamo (Tabla 1).

La complejidad de interconexiones, circuitos de retroalimentación y receptores tipo  $D_1$  y  $D_2$  sobre las mismas células, sugiere que una disminución en la concentración cerebral de DA sea funcionalmente importante para establecer diversos circuitos de control. Así, en adición al papel del Glu en la regulación fisiológica del movimiento se ha sugerido que el daño neuronal regulado por Glu en los ganglios basales tal vez el responsable de diferentes desórdenes neurodegenerativos como el de la pérdida de neuronas DAérgicas en el síndrome de Parkinson **(21,22)**.

## RECEPTORES A GLUTAMATO

En el sistema nervioso de vertebrados, la mayoría de las sinapsis excitadoras utilizan al glutamato (Glu) como neurotransmisor **(23,24)**, el cual se encuentra en altas concentraciones dentro del sistema nervioso central (SNC) y se libera de manera dependiente de  $Ca^{++}$ .

Los receptores a Glu se clasifican por su respuesta a agonistas específicos en: Receptores N-metil-D-aspartato (R-NMDA), alfa-amino-3-hidroxy-5-metil-isoxasol propionato (R-AMPA) y kainato (R-KA), receptores de tipo ionotrópico que permiten el flujo de cationes a través de la membrana de acuerdo con su gradiente de

concentración. Además, se han descrito receptores metabotrópicos para Glu que están acoplados a proteínas G y sistemas de segundos mensajeros **(25,26)** (Fig.4).

Se han identificado dos familias de subunidades que conforman el R-NMDA, la NR1 y la NR2 que codifica 4 genes diferentes (NR2A-D) **(27-29)**. Los R-NMDA heteroméricos nativos están compuestos por 5 subunidades. Se requiere por lo menos la presencia de una subunidad NR1 para una forma funcional del canal **(30,31)** (Tabla 2).

El R-NMDA se modula por diversos sitios efectores, primero el de reconocimiento a NMDA que está ligado a un canal catiónico que permite pasar al  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{++}$  cuando se une el agonista. La glicina es un co-agonista que se requiere para modular la apertura del canal en respuesta al NMDA. También incluye un sitio que reconoce a la fenciclidina, a la dizocilpina (MK-801), otro sitio de unión para magnesio y uno para el catión zinc. Así como un sitio que es modulado por poliaminas (PA) endógenas que ayudan a potenciar las acciones del NMDA, dependiendo de la concentración y un sitio sensible a cambios de oxido-reducción (sitio redox) **(27,32,33)** (Fig.5).

La excesiva activación de los R-NMDA y el subsecuente incremento de calcio intracelular inician algunas formas de la neurotoxicidad de Glu **(23)**. Esta activación del R-NMDA tiene como una consecuencia la activación de la óxido nítrico sintasa (ONS) que se encarga de sintetizar óxido nítrico (ON) **(34-36)**.

## **OXIDO NITRICO**

El óxido nítrico (ON) es una de las moléculas mensajeras biológicamente activas más pequeña con una gran cantidad de acciones fisiológicas y patofisiológicas. El ON es un gas que se produce por una familia de isoenzimas llamadas óxido nítrico sintasas (ONS), en las neuronas se encuentra la tipo ONSb (forma constitutiva) que está presente en condiciones fisiológicas. La expresión de ONSb, puede ser alterada por varios factores, esto es, varias formas de daño causan una sobrerregulación de la ONSb en las neuronas **(37-39)**. La ONS utiliza como sustrato

a la L-Arginina y produce citrulina y ON como co-producto, además su activación es dependiente de calcio-calmodulina **(40-42)**.

Una característica principal del ON es que atraviesa la membrana fácilmente por difusión y puede estimular la liberación de neurotransmisores presinápticos **(42)**. Uno de los mayores estímulos para la activación de la ONS es la excesiva activación del R-NMDA que permite que se eleve la entrada de calcio intracelular y lleve a una sobreproducción de ON y subsecuentemente a la neurodegeneración **(34)** por su contribución en la neurotoxicidad del Glu **(41)** (Fig.6).

El ON participa en la potenciación de largo término (PLT), tal vez actúe también como un factor trófico para el desarrollo de las neuronas, así como un regulador de la neurotoxicidad, especialmente en respuesta al glutamato **(43)**. Algunos estudios sugieren que la liberación de algunos neurotransmisores, como los aminoácidos excitadores y catecolaminas es influenciada por ON **(43-45)**.

El ON influye en la liberación de neurotransmisores, tal vez a través de la activación de GMPc, aumentando la fosforilación de las proteínas de las vesículas sinápticas asociadas con la liberación de neurotransmisores **(44,45)**. El papel de la producción de ON en la liberación de neurotransmisores regulada por R-NMDA es evidente en estudios en los que los inhibidores de ONS bloquean ésta liberación en sinaptosomas de la corteza cerebral o estriatales **(45)**.

# **ANTECEDENTES**

La activación de los R-GLU está asociada con muchas de las funciones del sistema nervioso, principalmente el de tipo NMDA favorece la plasticidad neuronal en procesos como el aprendizaje y la memoria **(21,46)**. También participa en el establecimiento de algunas alteraciones neurológicas, como el daño cerebral-isquémico, la epilepsia y la muerte celular **(47,48)**.

Dada las proyecciones cortico-estriatales, se ha sugerido la interacción entre el sistema glutamatérgico y el DAérgico. En algunos estudios de microdiálisis se ha demostrado que además del efecto estimulador del Glu sobre la liberación de DA estriatal, el kainato, el NMDA y el quisqualato también participan en esta liberación **(49-52)**, sin embargo, en base a las variadas características en las respuestas de cada uno de estos agonistas, se infiere que actúan por diversos mecanismos **(53-55)**.

La excesiva estimulación del R-NMDA conduce a una producción de ON por el incremento excesivo en los niveles de calcio intracelular, dando lugar al daño oxidativo y participar en la excitotoxicidad **(56-58)**.

Se sugiere que la producción de ON regula la liberación basal de DA, así como la estimulada por NMDA **(59-61)**, otros efectos del ON a nivel del SNC es causar daño neuronal, que tiene como consecuencia dar lugar a algunas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson **(62)**, que se caracteriza por presentar lesiones a nivel de los ganglios basales.

Por otro lado, la activación del R-NMDA en el cuerpo estriado provoca la liberación de poliaminas endógenas como la espermidina (Spd) y la espermina (Spm) **(63,64)**. Esto lleva a incrementar los eventos mediados por el R-NMDA, incluyendo la entrada de  $Ca^{++}$  y promover el daño excitotóxico **(65-67)**. Se ha demostrado que las PA están involucradas en el crecimiento normal y diferenciación de algunos tipos celulares y que también participan como neurotransmisores o neuromoduladores de la transmisión sináptica en el SNC **(63,68,69)**.

Estas PA interactúan con canales de  $Ca^{++}$  dependientes de voltaje, algunos estudios se han enfocado al canal del R-NMDA **(65,70,71)** y en la liberación del

transmisor DA que se incrementa endógenamente en rebanadas estriatales **(72,73)**.

La Spm y Spd en concentraciones altas son neurotóxicas. En estudios *in vivo*, esta neurotoxicidad es resistente al bloqueo con MK-801**(74,75)**. Sin embargo, la arcaína, un antagonista al sitio de PA, parece inhibir las acciones estimuladoras de las PA **(32,76,77)**. Las PA tienen una respuesta bifásica, posiblemente a dos sitios o dos mecanismos de acción **(78,79)**.

El sitio de PA puede estar localizado sobre un dominio intracelular o extracelular del R-NMDA en las regiones que atraviesan la membrana, o sobre fosfolípidos asociados con el R-NMDA. Algunos estudios con R-NMDA solubilizados sugieren que el sitio está asociado con otros componentes del R-NMDA y está localizado sobre la proteína de éste, más que sobre los fosfolípidos. Sin embargo, se han propuesto dos mecanismos para explicar la actividad de las PA: primero, en donde las PA son aplicadas exógenamente y capturadas rápidamente por las células para actuar en un sitio intracelular; y segundo, en donde las PA son selectivamente liberadas de almacenes endógenos hacia el espacio extracelular donde actúan con el R-NMDA **(63,65,70)**.

La facilidad de las PA para modular el R-NMDA y explicar las diferencias regionales en las respuestas del receptor puede verse modificada por la diferencia en el estado redox del R-NMDA, ya que este estado varía en diferentes regiones cerebrales dependiendo de las concentraciones de los agentes reductores endógenos **(80,81)**.

Desde que se demostró la existencia del sitio redox en el R-NMDA, se han descrito diversas observaciones sobre respuestas inducidas por NMDA, en preparaciones neuronales se observa un incremento por la participación de agentes reductores y una disminución por agentes oxidantes de grupos sulfhidrilos **(33,82,83)**.

El agente reductor ditioneitol (DTT) incrementa la respuesta electrofisiológica del NMDA, debido a la modificación química de uno o más enlaces disulfuro sobre el R-NMDA **(81,84-86)**. El ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) forma los enlaces

disulfuro de grupos tioles libres y disminuye la función del R-NMDA **(81,85,87)**.

Los enlaces disulfuro están formados por un par de cisteínas vecinales que están relacionados al sitio de unión de los agonistas. El DTT y el DTNB no son fácilmente permeables a la membrana, por lo que se cree que uno o más pares de residuos de cisteínas del R-NMDA estén expuestos a la parte extracelular **(82,88,89)**.

Recientemente se ha demostrado que el sitio modulador REDOX tiene importancia fisiológica y patofisiológica con radicales libres oxigenados endógenos, pudiendo interactuar y disminuir la actividad del R-NMDA **(82,90,91)**. Estos radicales libres actúan oxidando los grupos sulfhidrilo contenidos en proteínas modificando el R-NMDA **(33,91,91)**.

El R-NMDA parece mediar la regulación del transporte de DA **(49,52,53,55)**, ya que resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el NMDA, KA y L-Arginina, incrementan la liberación espontánea de DA-<sup>[3H]</sup> en rebanadas estriatales, efecto que se reduce en presencia de MK-801, GAMS y Nitro-arginina, respectivamente **(93)**. Estos efectos de agonistas glutamatérgicos sobre la liberación espontánea de DA-<sup>[3H]</sup>, sugieren la presencia de receptores a Glu sobre terminales DAérgicas **(94,95)**, que apoya la interacción entre los sistemas Glutamatérgico y DAérgico en el estriado a través de una posible modulación fisiológica de los receptores a Glu localizados sobre las terminales DAérgicas y su retroalimentación con la producción de ON cuyos efectos son experimentalmente evidentes a través de potenciar la liberación de Glu **(34,40,96)**. Por lo tanto, sí en la regulación de la neurotransmisión DAérgica en el estriado está involucrado el ON, no se debe de descartar la posibilidad de un efecto directo del ON sobre el sitio Redox del R-NMDA, el cual parece regular la activación de este receptor **(97,98)**. Por otro lado, la posible existencia de un sitio modulado por poliaminas sobre el mismo R-NMDA **(63,99,100)**, puede intervenir en el efecto potenciador de la L-Arginina sobre la liberación del neurotransmisor y no sólo como precursor de la producción de ON.

Sin embargo, con los datos obtenidos previamente no ha sido posible establecer

la correlación de estos sitios, por lo que este trabajo pretende establecer la interacción y regulación entre ambos sistemas y estos sitios, ya que sus mecanismos podrían ser determinantes para la iniciación y/o propagación del daño neurocitotóxico que se observa en algunas enfermedades neurodegenerativas en donde se implica la región estriatal del Sistema Nervioso Central.

Así como también, podría existir un sistema indirecto en el que la liberación de DA puede ser regulada por otros sistemas de neurotransmisión, como el colinérgico, el GABAérgico, entre otros, ejerciendo diferentes efectos moduladores sobre la liberación de este neurotransmisor **(101-103)**.

# **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Desde hace algunos años ha sido de gran interés estudiar la interacción de los sistemas DAérgico y Glutamatérgico, dada su implicación en diferentes procesos patológicos asociados a algunas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson. De acuerdo con los antecedentes y con resultados previos de nuestro laboratorio, donde se demostró que el sistema de transporte de DA se modifica después de la activación del R-NMDA y de la producción de ON, ha sido posible sugerir algunas de las implicaciones que podría tener la formación del ON por activación de R-Glu sobre el cuerpo estriado. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual el ON puede regular la liberación de DA en el estriado, así como la posible participación del R-NMDA a través de sus sitios sensibles a poliaminas y de óxido-reducción. Por lo que resulta importante establecer la participación de estos sitios específicos del R-NMDA sobre la regulación de la neurotransmisión DAérgica en el estriado.

**HIPOTESIS**

La liberación de DA en el cuerpo estriado depende de la activación del R-Glu tipo-NMDA, por lo que la producción de ON y la presencia del agonista al sitio a poliaminas y de agentes reductores aumentarán la liberación espontánea de DA.

# **OBJETIVOS**

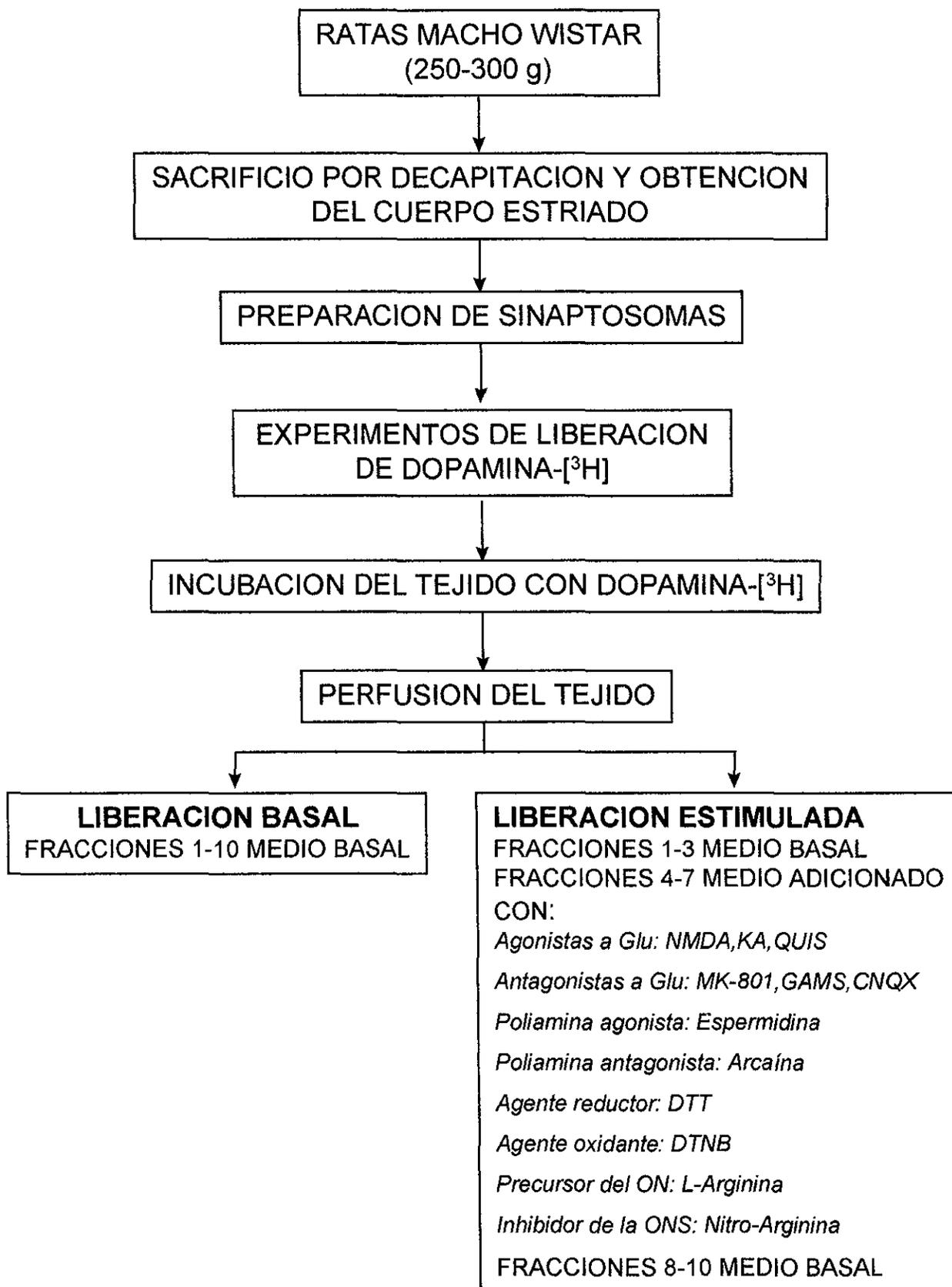
**GENERAL:**

Evaluar los efectos del ON y la participación de los sitios redox y de poliaminas del R-NMDA sobre la liberación de DA-[<sup>3</sup>H] en sinaptosomas estriatales.

**PARTICULARES:**

- 1.- Cuantificar la liberación de DA-[<sup>3</sup>H] en presencia de agonistas y antagonistas a Glu.
- 2.- Determinar la liberación de DA-[<sup>3</sup>H] en presencia del precursor e inhibidor de la síntesis de ON.
- 3.- Determinar la liberación de DA-[<sup>3</sup>H] en presencia de agonistas y antagonistas al sitio sensible a poliaminas.
- 4.- Cuantificar la liberación de DA-[<sup>3</sup>H] en presencia de agentes reductores y oxidantes con actividad sobre el sitio redox del R-NMDA.

# **DIAGRAMA EXPERIMENTAL**



# **MATERIAL Y METODOS**

## Material

Las diversas drogas que se utilizaron en el presente trabajo tales como: L-Arginina (ARG, precursor de la síntesis de ON), Iproniazid, espermidina (SPD, agonista al sitio de PA), ditioneitol (DTT, agente reductor), ácido di-tio-bis-nitrobenzoico (DTNB, agente oxidante) y L-N<sup>G</sup>-Nitroarginina (Ni-ARG, inhibidor de la ONS) fueron adquiridas en Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA); mientras que el N-metil-D-aspartato (NMDA), Kainato (KA) y Quiscualato (QUIS) (agonistas a Glu); Dizocilpina (MK-801), ácido D-gamma-glutamilaminometanosulfónico (GAMS), 6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) (antagonistas a Glu) y arcaína (ARC, inhibidor del sitio a PA) se obtuvieron de RBI (Natick, MA, EUA). El resto de los reactivos como: NaCl, NaHCO<sub>3</sub> y CaCl<sub>2</sub> se obtuvieron de J.T. Baker; KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, glucosa y ac. ascórbico fueron de Merck.

La [<sup>3</sup>H]-dihidroxifeniletilamina, [<sup>3</sup>H]-Dopamina ó [<sup>3</sup>H]-DA (31 Ci/mmol) se adquirió de NEN-Dupont.

## Composición de las Soluciones

El medio de incubación para captura que se utilizó fue una solución Krebs-bicarbonato, con la siguiente composición: NaCl 110 mM, KCl 3mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Glucosa 10 mM. Mientras que la composición del medio de liberación Krebs-bicarbonato consistió de lo siguiente: NaCl 115 mM, KCl 3mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Glucosa 10 mM; ambas soluciones se les adicionó ac. ascórbico 0.1 mM e Iproniazid a 25 μM, a un pH ajustado de 7.2-7.4 con una mezcla de CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> (5%-95%) **(104)**.

## Preparación del tejido

Se utilizaron 200 ratas macho adultas de la cepa Wistar con un peso aproximado de 250-300 g, las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio con ciclos de luz-oscuridad 12x12 h con libre acceso al agua y alimento.

Los animales se sacrificaron por decapitación, se removió el encéfalo y se lavó

inmediatamente con una solución de sacarosa 0.32 M entre 0-4 °C. Se disectó el cuerpo estriado y se obtuvo la fracción sinaptosomal.

### **Preparación de sinaptosomas**

El cuerpo estriado se homogeneizó en un homogeneizador vidrio-teflón en sacarosa 0.32 M. Después se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos (Sorvall), el sobrenadante se recentrifugó a 12,000 rpm durante 10 min, obteniendo así la fracción sinaptosomal cruda (P<sub>2</sub>) **(105)**. Por cada ensayo se tomaron 200µl de la fracción sinaptosomal (600 µg de proteína). Los sinaptosomas fueron sometidos a experimentos de liberación espontánea de DA-[<sup>3</sup>H] en ausencia y presencia de las diferentes drogas, para los experimentos se utilizaron todas las drogas a la concentración de 10µM.

### **Experimentos de liberación**

Los experimentos se llevaron a cabo según lo descrito previamente por Beas-Zárate y col. **(106)** que consiste en: preincubar los sinaptosomas en 1 ml del medio de captación en un baño María con agitación a 37 °C por 10 min, después se adicionó 20 µl de DA-[<sup>3</sup>H] para una concentración final de 0.1 µM en el medio y se incubó durante 20 min. Posteriormente, las muestras se trasladaron a un sistema de perfusión (Brandel) de seis vías y se perfundieron con el medio de liberación descrito anteriormente, a un flujo de 0.5 ml/min durante 10 min para lavar el tejido, después se realizaron 3 colectas a un flujo de 0.25 ml/min de 10 min cada una para las seis vías. Posteriormente, en las vías 2-6 se perfundieron con medios que contenían las diferentes drogas recolectando 5 muestras de 10 min cada una, al término de las cuales se sustituyó nuevamente al medio basal y se realizaron 3 colectas adicionales de 10 min. La vía 1 se mantuvo durante todo el tiempo con medio normal, tomando la liberación obtenida de esta vía como liberación basal.

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

contador de centelleo líquido Beckman modelo LS6000.

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

$$\% \text{ Liberación} = \frac{\text{Radiactividad liberada en 10 min}}{\text{Radiactividad total}^*} \times 100$$

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

Los resultados se expresaron en sobreflujo de la fracción con mayor liberación, tomándose como liberación basal el 0 %.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron por medio de las pruebas t de Student y ANOVA de una cola. La significancia estadística que se consideró fue de una  $\star P < 0.001$ ,  $\dagger P < 0.01$  y  $* P < 0.05$ .

# **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos demuestran que los agonistas glutamatérgicos NMDA, KA y QUIS fueron capaces de estimular la liberación de DA en un orden del 346, 250 y 41% respectivamente, en comparación con la liberación basal del neurotransmisor (Gráfica 1A-C).

Sin embargo, la presencia de Ni-ARG (inhibidor de la síntesis de ON), MK-801, GAMS Y CNQX (antagonistas al R-Glu) en forma independiente redujeron la liberación estimulada por los agonistas a Glu respecto al valor basal (Gráfica 1 A-C).

De igual manera que los agonistas de Glu, la ARG (10 $\mu$ M), tuvo un efecto estimulador de mayor intensidad en un rango de 79%, sobre la liberación de DA. La aplicación de Ni-ARG (10 $\mu$ M) revirtió de manera significativa el efecto de la ARG (Gráfica 1A-C). La combinación de ARG con NMDA mostró un efecto estimulador mayor que el agonista solo, pero sin llegar a ser aditivo. Aún así, la Ni-ARG y el antagonista a NMDA inhibieron la estimulación de la liberación de DA (Gráfica 1A).

Por otro lado, la ARG potenció el efecto estimulador del KA al incrementar la liberación hasta en un 333%. Esta estimulación fue disminuída significativamente por Ni-ARG y GAMS (Gráfica 1B).

El efecto del QUIS sobre la liberación de DA-[<sup>3</sup>H] fue pequeño, aún en combinación con la ARG, mostrando un valor del 37%. Mientras que la combinación QUIS y Ni-ARG ejerció un efecto inhibitorio significativo de la liberación de DA-[<sup>3</sup>H] estriatal.

Además, los sitios de regulación del R-NMDA también mostraron efectos sobre la regulación de la liberación de DA. La presencia de SPD (agonista al sitio PA) mostró un efecto de estimulación de un 162% y su combinación con el NMDA incrementó al doble su efecto (Gráfica 2A), pero sin rebasar el valor sólo del NMDA. Estos efectos se vieron revertidos tanto por la ARC (antagonista al sitio PA), como por el MK-801 antagonista glutamatérgico (Gráfica 2A).

Por otro lado, la participación del sitio de PA con la producción de ON está involucrada en la liberación de DA tal vez sin estimular directamente el sitio a NMDA. El efecto de SPD con ARG fue de un 500% (Gráfica 2B), efecto parecido a

cuando se adicionó con NMDA (Gráfica 2C). Los efectos de esta combinación, así como de forma independiente, prácticamente se inhibieron tanto por Ni-ARG como por ARC (Gráfica 2B).

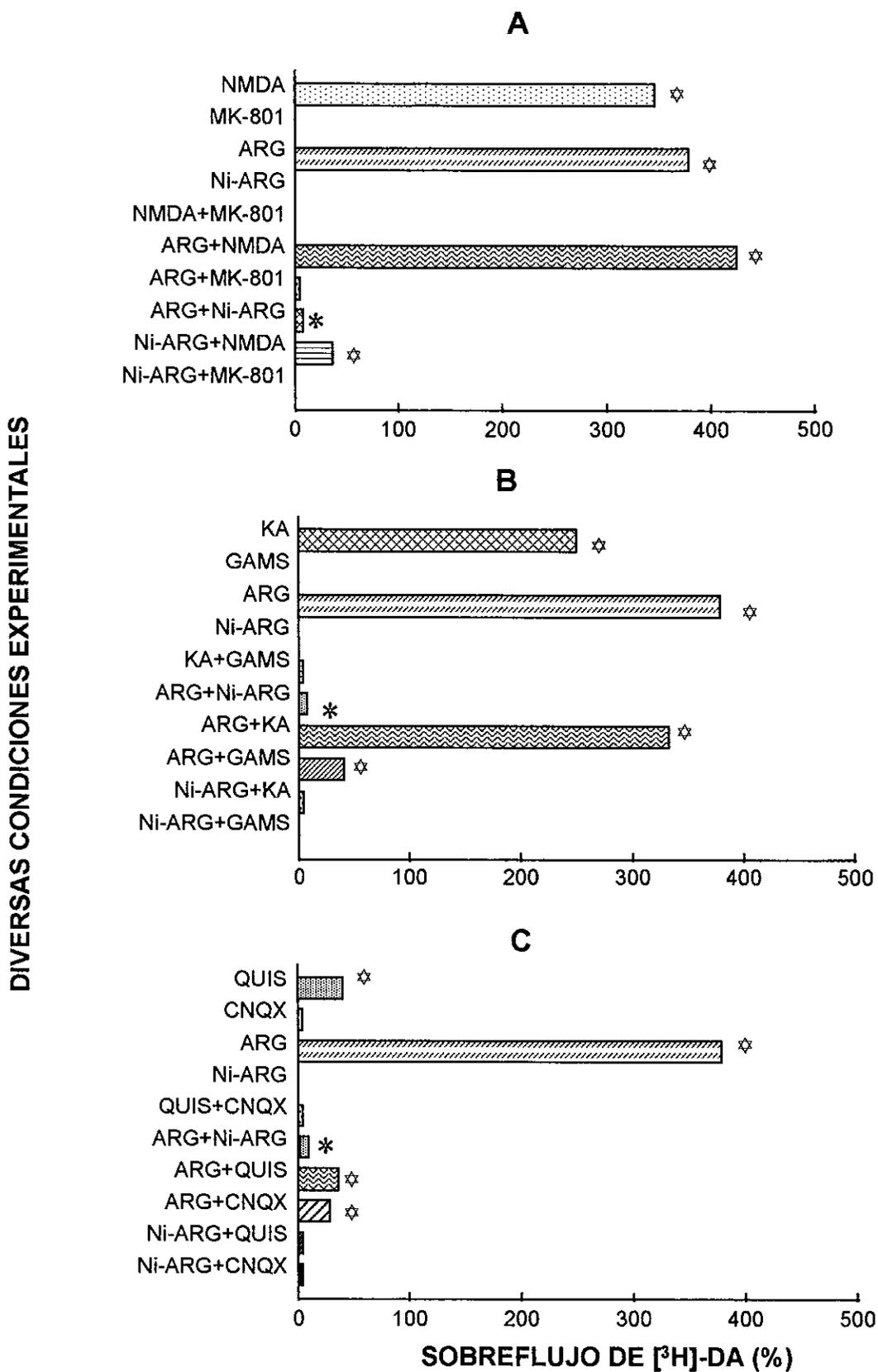
La combinación de los efectos de la producción de ON con los sitios de regulación del R-NMDA, ejercieron efectos estimuladores de mayor orden. La SPD junto con el NMDA y la ARG mostraron un efecto del 537%, siendo éste mayor que cada uno sólo. Estos efectos sobre la liberación de DA se vieron disminuídos por la ARC y la Ni-ARG de manera significativa (Gráfica 2C).

Por otro lado, el agente reductor DTT ejerció una estimulación similar a la SPD (162%), en tanto que su combinación con NMDA no se observó modificada. El agente oxidante DTNB inhibió el efecto estimulador del DTT y del NMDA sobre la liberación espontánea de DA- $[^3\text{H}]$  (Gráfica 3A).

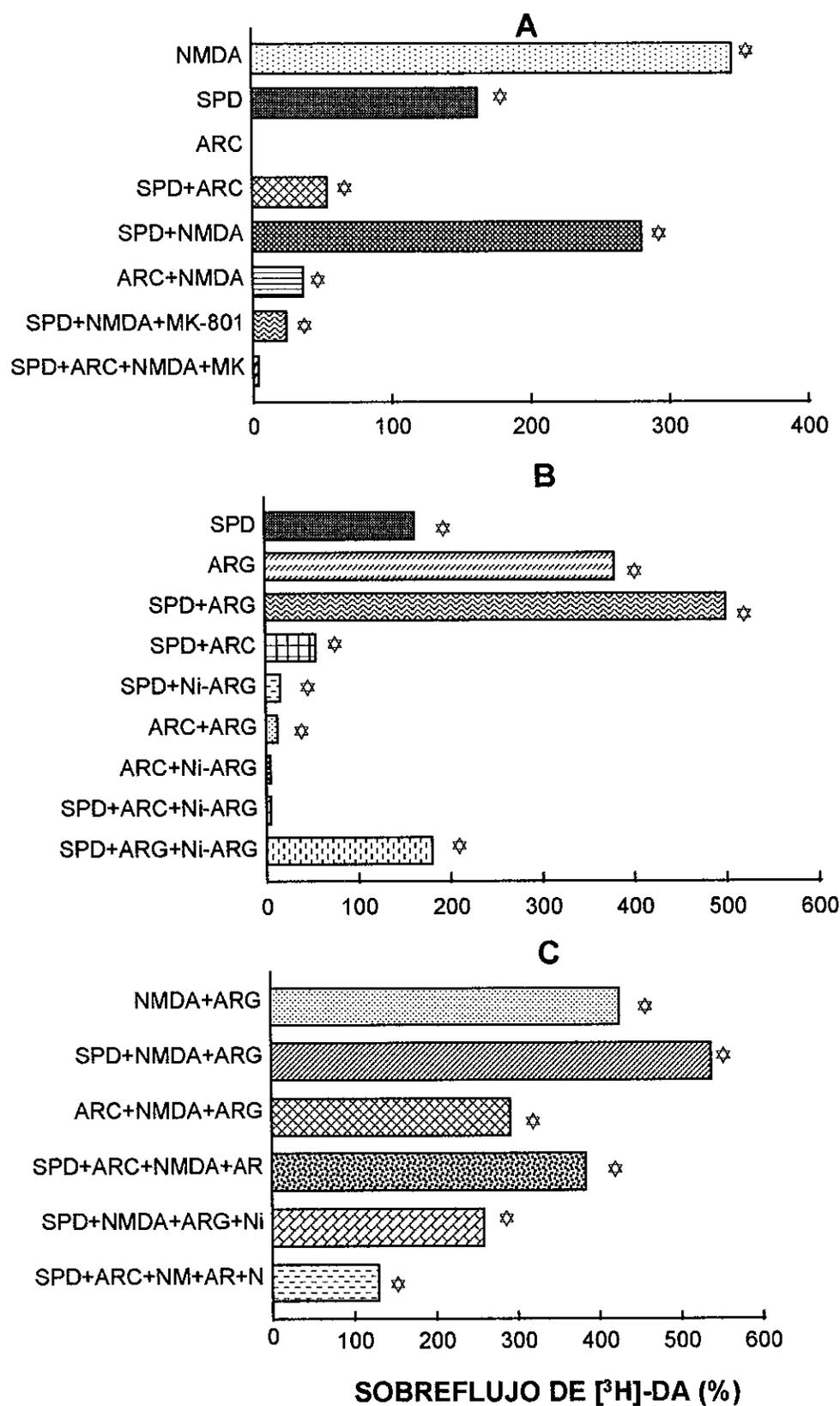
La síntesis de ON junto con la activación del sitio REDOX mostró efectos estimuladores, esto es, el DTT y la ARG estimulan la liberación en un 333%, y esta fue ligeramente reducida con la adición de DTNB. No obstante, la Ni-ARG en forma combinada con DTNB mostraron un mayor efecto de inhibición para ésta combinación y para el DTT en forma independiente (Gráfica 3B).

Así también, la combinación de ARG con el DTT y NMDA incrementó en un 429% la liberación de DA, efectos que se redujeron al adicionar DTNB y éste a su vez se revirtió nuevamente con DTT (Gráfica 3C). Los efectos estimuladores de la ARG con el NMDA y DTT sobre la liberación de DA fueron mayormente reducidos con Ni-ARG y aún más al adicionar DTNB juntos (Gráfica 3C).

Finalmente, los efectos de la combinación de SPD con DTT nos mostró la participación de los sitios a PA y REDOX sobre la regulación de la liberación de DA, ya que su efecto estimulador fue significativo con respecto a la basal (212%), este efecto se disminuyó con DTNB, sin embargo, la ARC no mostró el mismo efecto de inhibición sobre el DTT, como el DTNB sobre la SPD (Gráfica 4).

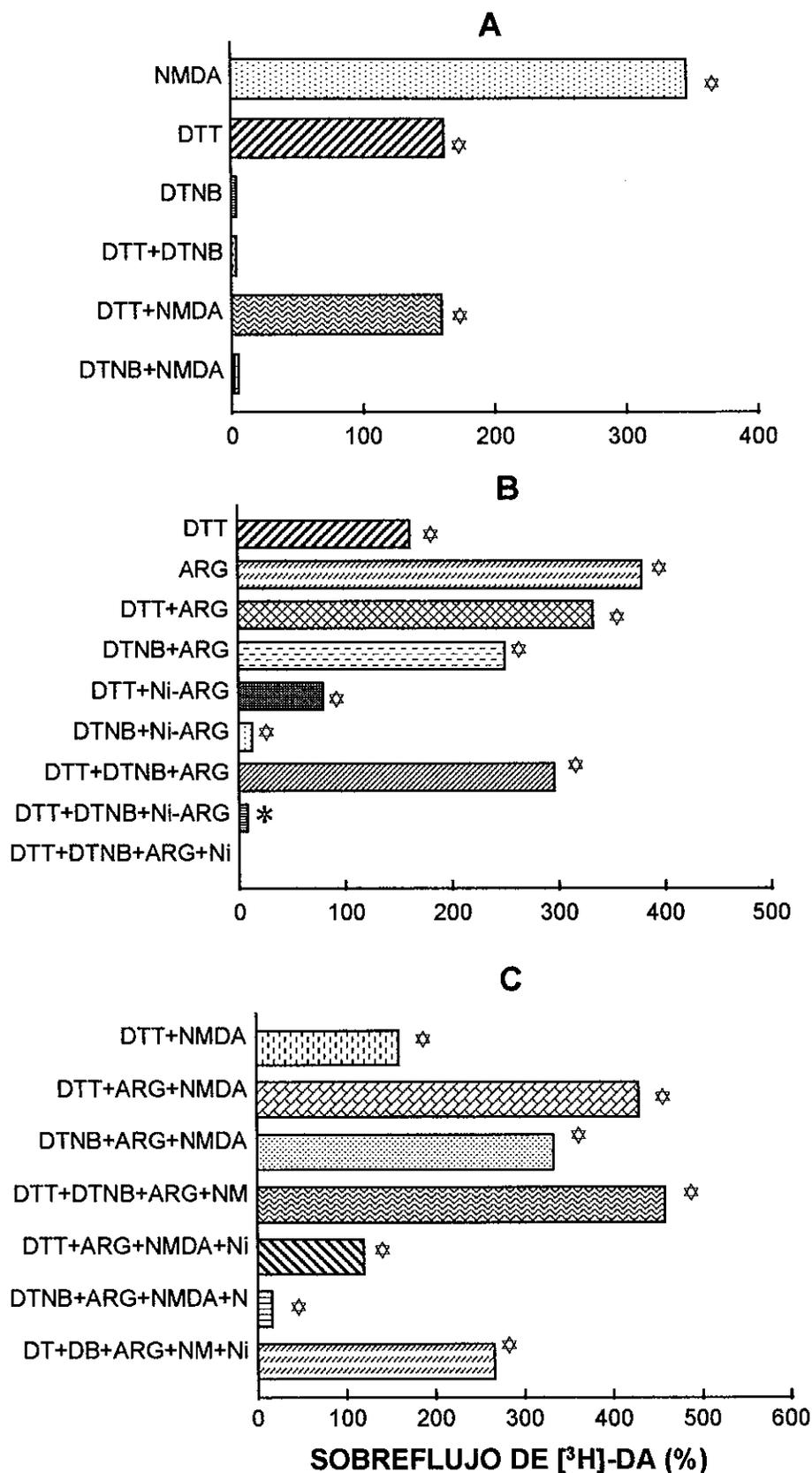


**GRAFICA 1. Liberación de DA-[3H] en sinaptosomas estriatales. A.** Efecto del Receptor a NMDA. **B.** Efecto del Receptor a Kainato. **C.** Efecto del Receptor a Quisqualato. ☆ p<0.001, † p<0.01, \* p<0.05 vs Basal (0%).

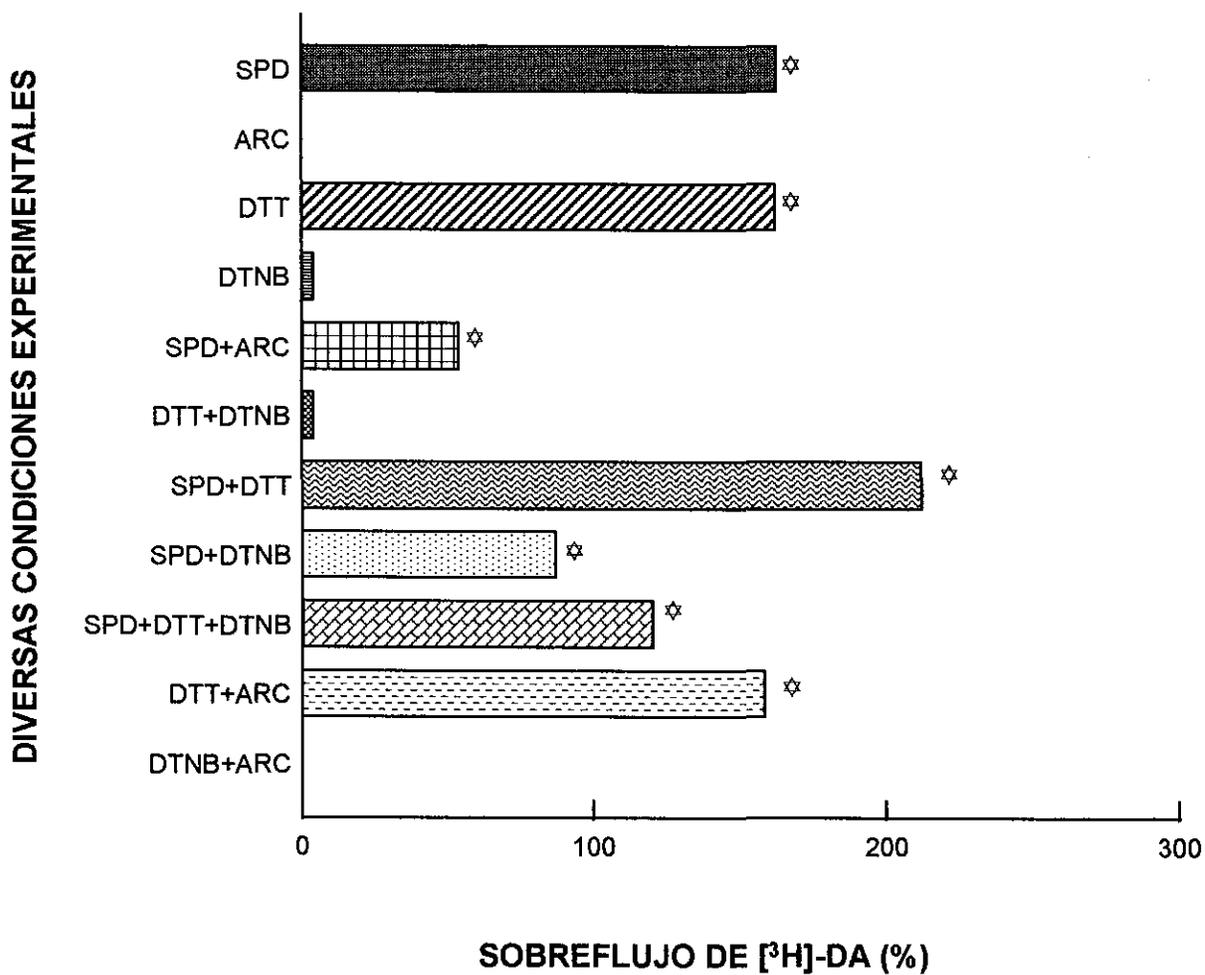
**DIVERSAS CONDICIONES EXPERIMENTALES**


**GRAFICA 2. Liberación de DA-<sup>3</sup>H en sinaptosomas estriatales. A. Efecto de NMDA-PA. B. Efecto de PA-ON. C. Efecto de NMDA-PA-ON. ☆ p<0.001, † p<0.01, \* p<0.05 vs Basal (0%).**

## DIVERSAS CONDICIONES EXPERIMENTALES



**GRAFICA 3. Liberación de DA-[<sup>3</sup>H] en sinaptosomas estriatales. A. Efecto de NMDA-REDOX. B. Efecto REDOX-ON. C. Efecto de NMDA-REDOX-ON. ☆ p<0.001, † p<0.01, \* p<0.05 vs Basal (0%).**



**GRAFICA 4.** Liberación de DA-[<sup>3</sup>H] en sinaptosomas. Efecto sobre el sitio a poliaminas y redox. ☆ p<0.001, † p<0.01, \* p<0.05 vs Basal (0%).

# **DISCUSSION**

Dentro del SNC la activación del receptor glutamatérgico tipo-NMDA participa en la transmisión sináptica excitadora **(41,47,48)**, la cual parece estar asociada con los procesos de plasticidad y degeneración neuronal **(23,47)** a través de mecanismos que implican la producción de ON **(56)**, por lo que en el presente trabajo se realizaron experimentos con el propósito de determinar si la modulación que ejerce el Glu sobre la liberación de DA estriatal está asociada con la activación del R-NMDA y con la producción de ON. Además, se caracterizaron los efectos de las poliaminas y de agentes oxidantes y reductores sobre la liberación de DA estriatal estimulada por NMDA.

Los resultados obtenidos indican que todos los agonistas glutamatérgicos probados tienen un efecto potenciador sobre la liberación de DA estriatal, sin embargo, la intensidad de este efecto fue mayor en el caso del NMDA y menor en el caso del QUIS. El efecto potenciador del NMDA, KA y QUIS fue completamente eliminado por los antagonistas específicos correspondientes. En relación con estos resultados, se ha propuesto que la DA que se libera tónicamente depende de la acción presináptica del GLU sobre terminales DAérgicas **(107)**. Además, se ha observado que la estimulación de la corteza frontal incrementa la liberación tónica de DA estriatal **(108)** a través de las aferencias cortico-estriatales glutamatérgicas, mediante la activación de receptores NMDA **(107)** y no-NMDA **(109)** localizados sobre terminales DAérgicas **(107)**. De tal forma, la intensidad del efecto estimulador de los análogos de GLU sobre la liberación de DA depende no sólo del tipo de receptor que activen, sino también de la densidad de dichos receptores sobre las terminales DAérgicas. Por lo que nuestros resultados sugieren: por un lado, una menor densidad de R-QUIS sobre terminales DAérgicas en comparación a los receptores para NMDA y KA; y por otro, la posibilidad de que el efecto despolarizante inducido por QUIS sea menor que el inducido por los otros dos agonistas.

Además, los resultados indican que la liberación DA estimulada por NMDA y KA

depende de la producción de ON **(45,110)**, ya que la ARG, precursor de la síntesis de ON a concentraciones menores de 100  $\mu\text{M}$  **(34,35,38)**, elevó la liberación espontánea de DA, en tanto que, la presencia de Nitro-Arg, inhibió la liberación de DA estimulada por NMDA y KA. Por otro lado, la combinación del NMDA con ARG aumentó la liberación de DA en mayor proporción que cuando se aplicaron independientemente. Este resultado sugiere que la ARG, además de promover la formación de ON, podría actuar como PA y potenciar la actividad del R-NMDA **(93)**, tal como lo hacen SPM y SPD al aumentar las corrientes de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Na}^+$  activadas por NMDA, lo que favorecería aún más la liberación del neurotransmisor **(111-113)**.

Diferentes evidencias experimentales han demostrado que la SPD eleva la liberación de neurotransmisores estimulada por NMDA a través del sitio a PA. Sin embargo, en nuestros resultados la SPD disminuyó significativamente la liberación de DA estimulada por NMDA. En este sentido, se ha propuesto recientemente que las PA aplicadas extracelularmente, pueden bloquear parcialmente el canal del R-NMDA al interactuar con residuos de aminoácidos cargados negativamente del interior del canal, lo que podría disminuir el flujo iónico y la actividad del R-NMDA **(68,71,114)**. Por otro lado, estudios recientes han demostrado que los efectos de las PA específicas al interactuar sobre el R-NMDA, dependen de las subunidades que lo componen **(66,115)**. Así, los R-NMDA heteroméricos conformados por las subunidades NR1A con cualquiera de las subunidades NR2 muestran efectos diferenciales para las PA **(114,116)**.

Los resultados también muestran que la combinación de ARG y SPD liberan DA en menor proporción que cuando se adicionan individualmente, lo que nos sugiere la posibilidad de que la ARG actúe en un sitio diferente al de las PA o bien, que ambas PA actúen sobre el mismo sitio sobresaturándolo, lo que ocasionaría una menor estimulación debido a la respuesta bifásica del R-NMDA a las PA **(63,80)**. Por otro lado, la ARC tiene un efecto predominantemente inhibitor sobre la liberación de DA estimulada por NMDA, en este sentido existen evidencias de que la ARC actúa como bloqueador del canal que conforma el R-NMDA **(76,77)**.

Diversos estudios demuestran la existencia del sitio REDOX del R-NMDA sensible a agentes oxidantes y reductores, los cuales modifican su función **(33,82,87)**. Así, el DTT es un agente reductor que aumenta la respuesta del R-NMDA y su efecto se revierte por el agente oxidante DTNB. Sin embargo, los resultados observados en el presente trabajo, muestran que el DTT no modifica la liberación de DA cuando se aplica junto con el NMDA. En este sentido, se ha demostrado que la activación del R-NMDA induce la producción radicales libres, los cuales modifican la conformación del sitio REDOX y disminuyen la actividad del R-NMDA al reducir la corriente de  $\text{Ca}^{++}$  activada por NMDA **(86)**. Además, el ON puede interactuar con los grupos -SH libres para formar compuestos S-nitrosotioles, sirviendo como un agente oxidante al promover la formación de enlaces disulfuro **(86,117)**. Por lo que es posible que el ON interactúe con el sitio REDOX del R-NMDA modulando negativamente su actividad y compitiendo con el efecto reductor del DTT. Sin embargo, cuando se aplica DTT en combinación con ARG se observa un incremento en la liberación de DA, posiblemente por el efecto tipo PA que pudiera ejercer la ARG. De manera similar, la aplicación de DTT en combinación con SPD elevó la liberación de DA, debido probablemente a un estado de mayor activación del R-NMDA.

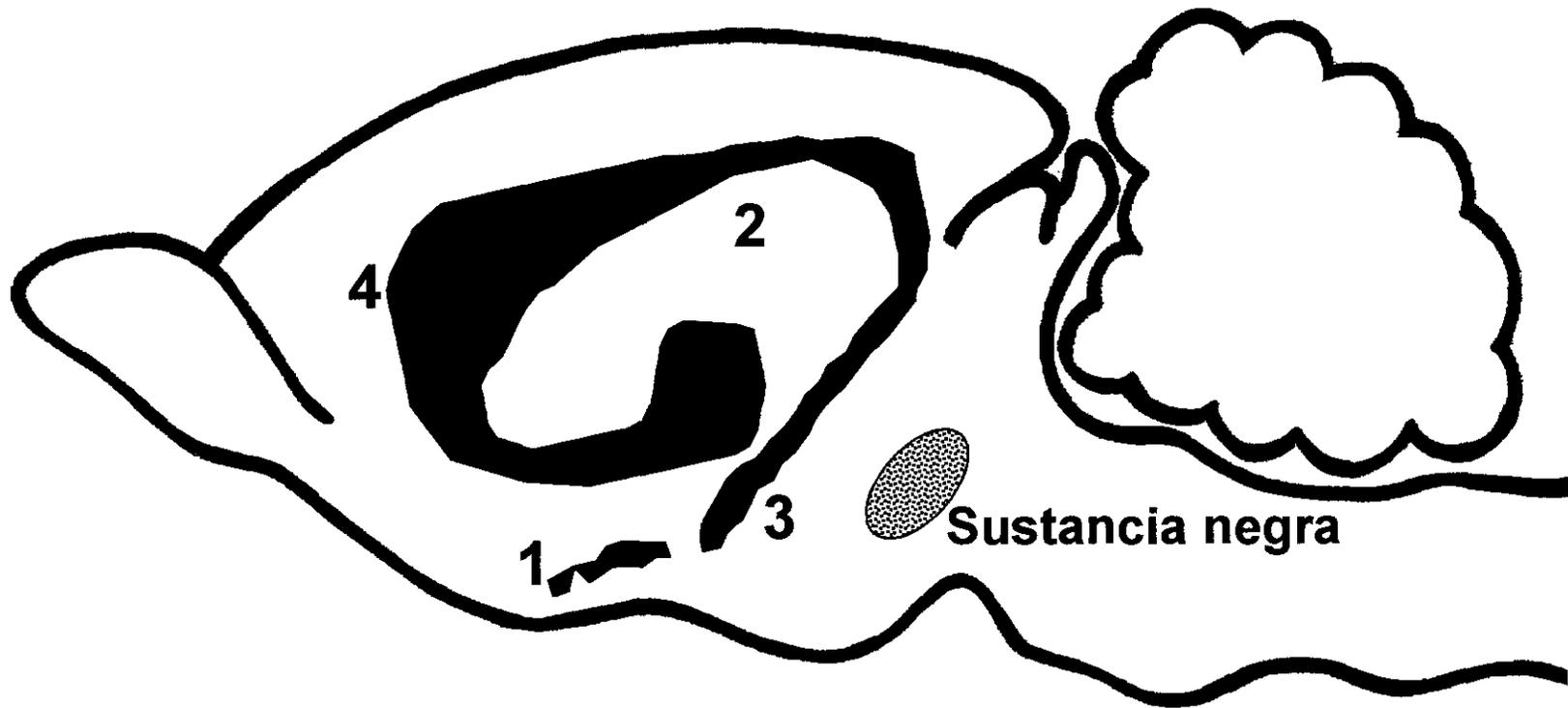
Por otro lado, el DTNB disminuyó la liberación de DA estimulada por NMDA, ARG o SPD, debido a los cambios conformacionales inducidos por el agente oxidante, los cuales modifican la permeabilidad del canal **(118,119)**, sin embargo, recientemente se ha sugerido que los agentes REDOX también modifican la conformación del sitio sensible a PA **(32,81)**.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, proponemos que el Glu estimula la liberación de DA estriatal fundamentalmente a través de la activación del R-NMDA, por lo que las neuronas DAérgicas podrían ser altamente susceptibles al daño excitotóxico mediado por la activación de este tipo de receptores. Además, los resultados obtenidos sugieren que drogas como el MK801, el DTNB y la ARC pueden tener algún efecto terapéutico en problemas degenerativos asociados con el daño neuronal excitotóxico.

# **CONCLUSIONES**

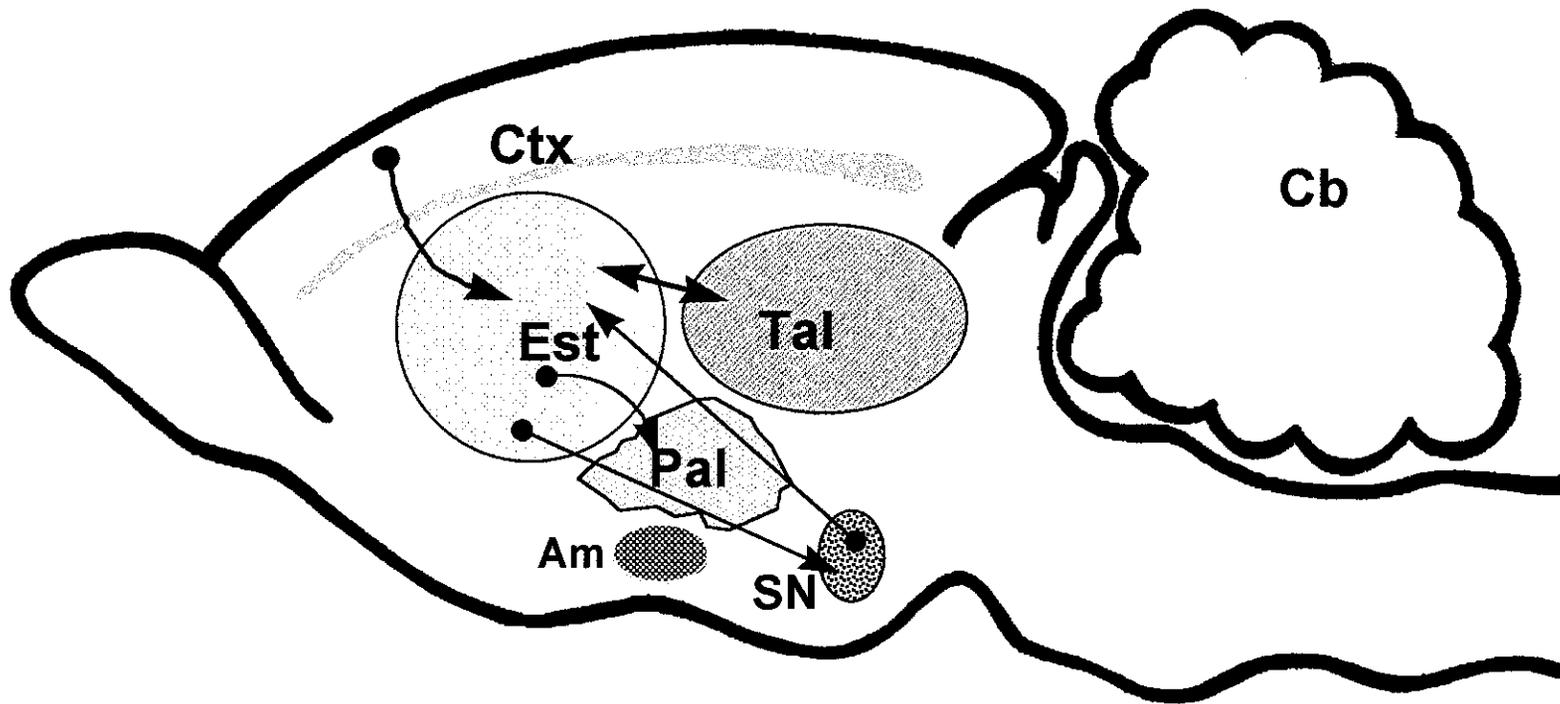
1. La activación de los diferentes tipos de receptores ionotrópicos para Glu (NMDA, KA, QUIS) tienen un efecto potenciador sobre la liberación espontánea de DA, el cual parece estar relacionado con la síntesis de óxido nítrico, ya que la presencia de la Nitro-Arg reduce este efecto.
2. El efecto potenciador máximo de la ARG sobre la liberación espontánea de DA en comparación al que ejercen los agonistas de Glu, se debe posiblemente a que además de promover la producción de ON, esté interactuando con el sitio sensible a poliaminas del R-NMDA.
3. Los agentes REDOX modifican la conformación del sitio sensible a PA, lo que conduce a un estado de mayor activación del R-NMDA y un incremento en la liberación de DA.
4. El efecto estimulador de los agonistas a Glu sobre la liberación espontánea de DA, sugiere que las células DAérgicas pueden ser susceptibles al daño neuronal excitotóxico, mecanismo que puede estar implicado en el establecimiento de padecimientos neurodegenerativos, como el Parkinson.

# **FIGURAS Y TABLAS**



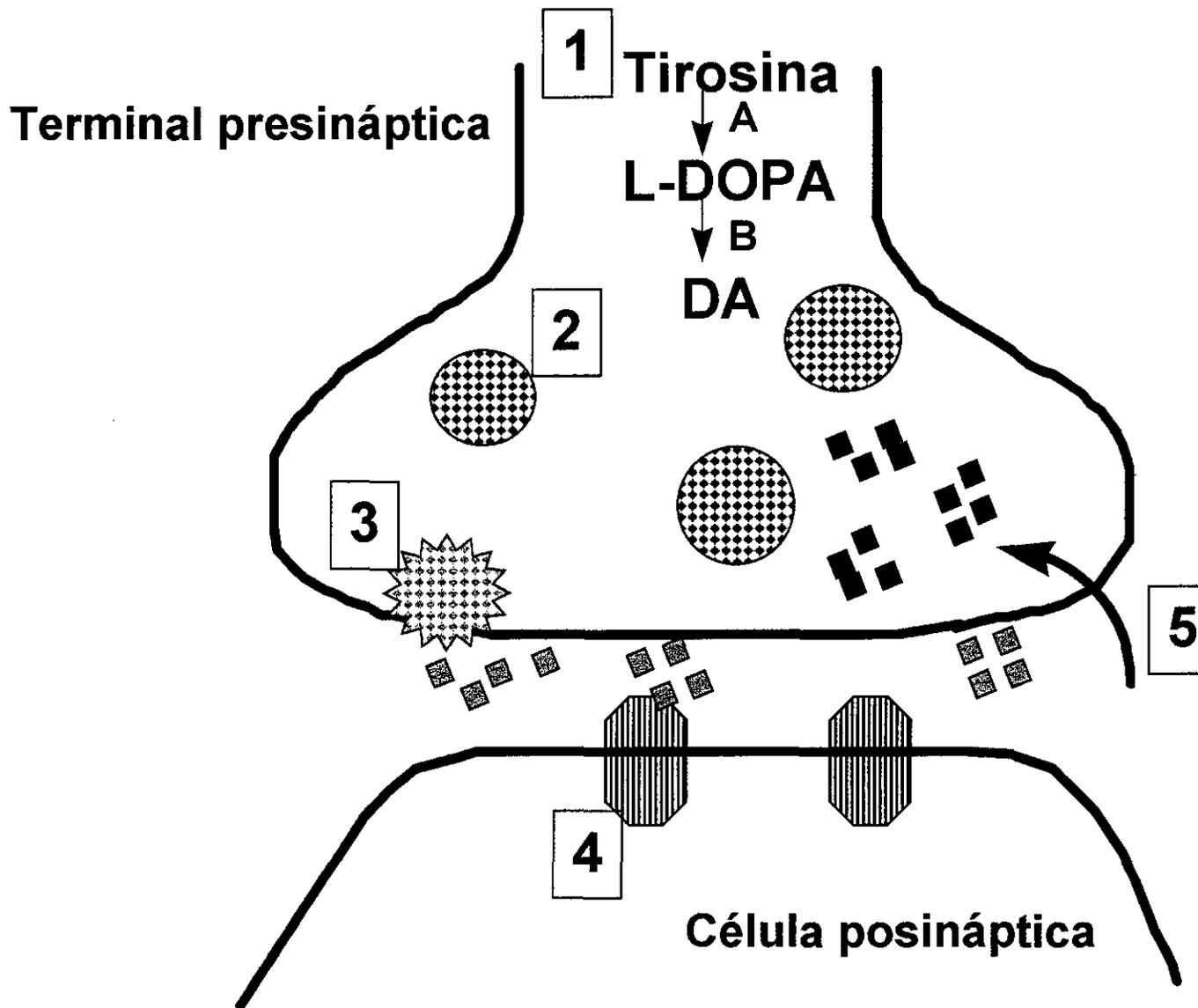
### FIGURA 1. NUCLEOS BASALES

1. Clastrum; 2. Núcleo lenticular; 3. Núcleo amígdalino; 4. Núcleo caudado  
Los tres últimos forman el cuerpo estriado.



**FIGURA 2. PRINCIPALES CONEXIONES DEL CUERPO ESTRIADO**

Am: amígdala; Cb: cerebelo; Ctx: corteza cerebral;  
 Est: estriado; Pal: pálido; SN: sustancia negra; y T: tálamo

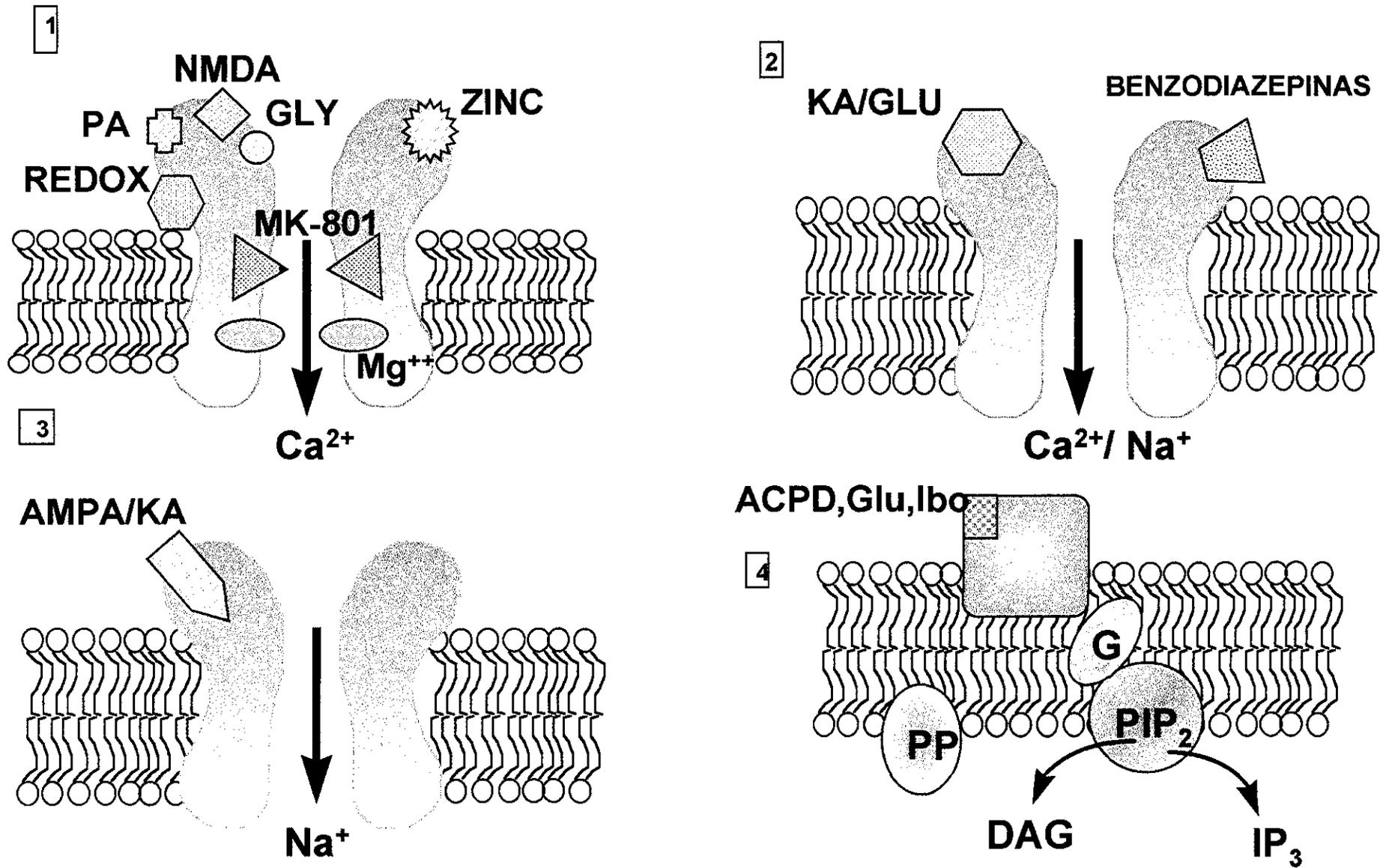


**FIGURA 3. SINAPSIS DOPAMINERGICA.** 1. SÍNTESIS. A: Tirosina, B: Descarboxilasa a.a. aromáticos. 2. VESICULACION. 3. LIBERACION. 4. INTERACCION CON EL RECEPTOR. 5. RECAPTURA.

# TABLA 1

## TIPOS DE RECEPTORES A DOPAMINA

FAMILIAS	SUBTIPOS	BIOLOGIA	LOCALIZACION
D 1	D1	ACTIVAN ADENILATO CICLASA	ESTRIADO, AMIG- DALA, TALAMO, HI POTALAMO.
	D5	CICLASA	HIPOCAMPO, HIPOTALAMO.
D 2	D2	INACTIVAN	ESTRIADO, HP, HIPOTALAMO
	D3	ADENILATO CICLASA	ESTRIADO, SUSTANCIA NEGRA.
	D4		AMIGDALA, CORTEZA, ESTRIADO, HP.

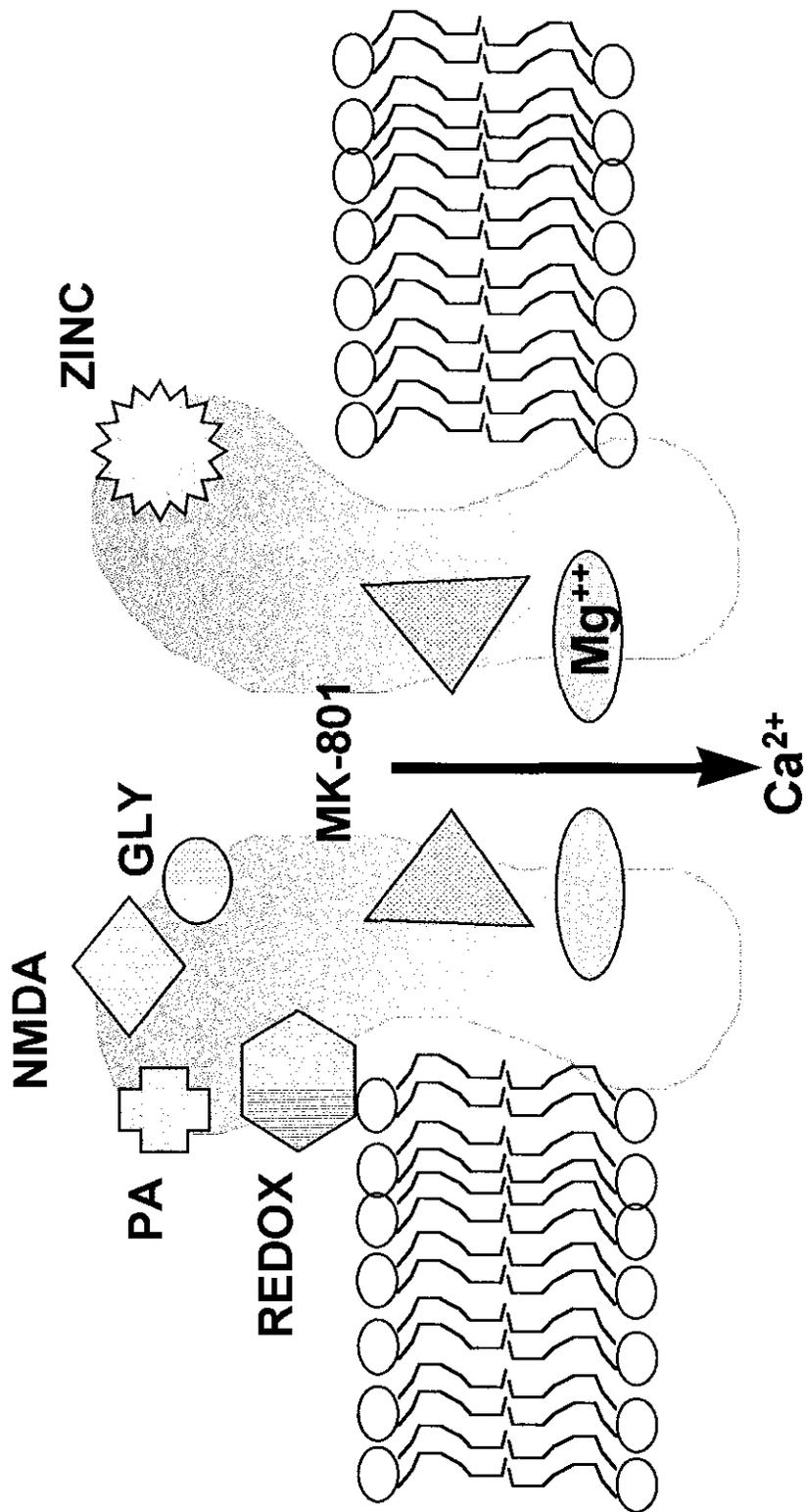


**FIGURA 3. RECEPTORES A GLUTAMATO.** 1. Tipo NMDA, 2. Tipo Kainato, 3. Tipo AMPA/Kainato, 4. Tipo Metabotrópico.

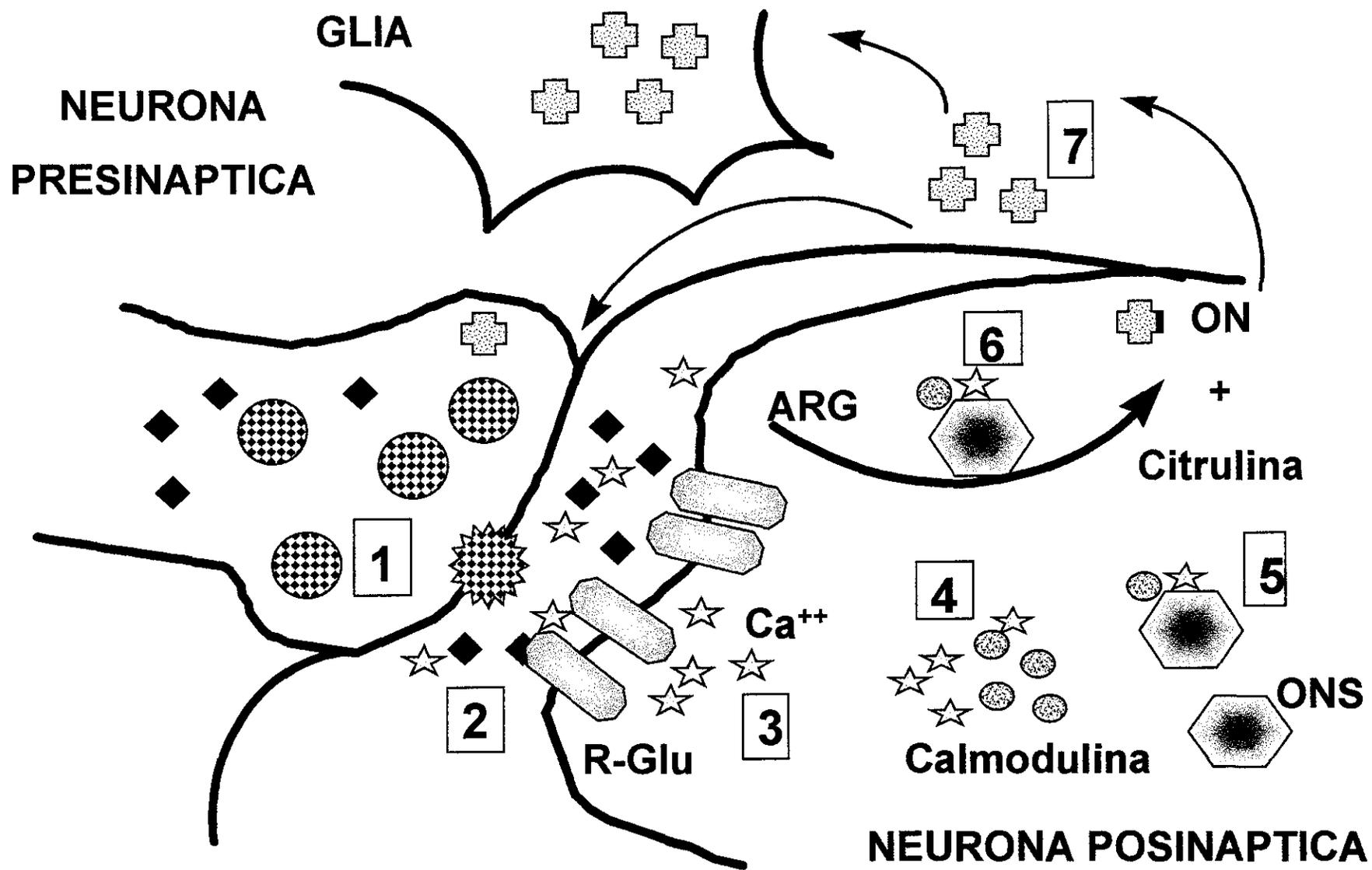
## TABLA 2

### SUBUNIDADES DEL R-NMDA

TIPO	VARIANTES	COMBINACION	FUNCION
NR1	a-i	NR1 con NR2	Canal activado. Permeabilidad al calcio. Bloqueado por MK-801.
NR2	A-D	NR2	Receptor no funcional.



**FIGURA 5.** Sitios de modulación del receptor NMDA.



**FIGURA 6. SINTESIS DE OXIDO NITRICO.** 1. Liberación de Glu. 2. Activación de R-Glu posináptico. 3. Entrada de calcio. 4. Formación del complejo calcio-calmodulina. 5. Activación de la ONS. 6. Síntesis de ON. 7. Difusión de ON.

# **BIBLIOGRAFIA**

coupling: An aequorium study in squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72:187-190.

14.- **Fuller R.W.** (1993) Biogenic amine transporters. *Neurotransmissions*. IX(2):1-3.

15. **Henry J.P., Bolton D., Sagne C., Isambert M.F., Desnos C., Blanchard V., Raisman-Vozari R., Krejci E., Massoulie J. y Gasnier B.** (1994). Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *J. Exp. Biol.* 196:251-262.

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

17.- **Civelli O., Bunzow J.R. y Grandy D.K.** (1993). Molecular diversity of the dopamine receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:281-307.

18.- **Sibley D.R. y Monsma F.J. Jr.** (1992). Molecular biology of dopamine receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* 13:61-69.

19.- **Civelli O., Bunzow J.R., Grandy D.K., Zhou Q.Y. y Vantol H.M.M.** (1991). Molecular biology of the dopamine receptors. *Eur. J. pharmacol.* 207:277-286.

20.- **Bédard P., Laroche I., Parent A. y Poirier L.** (1969). The nigrostriatal pathway: A correlative study based on neuroanatomical and neurochemical criteria in the cat. *Exp. Neurol.* 25:365-377.

21.- **Standaert D.G., Testa C.M., Young A.B. y Penney J.B.** (1994). Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. *J. of comparative neurology.* 343:1-16.

22.- **Albin R.L. y Greenmyre J.T.** (1992). Alternative excitotoxic hypothesis. *Neurology.* 42:733-738.

23.- **Scheetz A.J. y Constantine-Paton M.** (1994). Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J.* 8:745-752.

24.- **Collingridge G.L. y Lester R.A.J.** (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 40:143-210.

25.- **Yu A.C.H., Lee Y.L. y Eng L.F.** (1992). Glutamate as an energy substrate for neuronal-astrocytic interactions. *Progress in Brain Res.* 94:251-259.

- 26.- **Watkins J.C., Krogsgaard-Larsen P. y Honore T.** (1990). Structure-activity relationship in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends. Pharmacol. Sci.* 11:25-33.
- 27.- **McBain C.J. y Mayer M.L.** (1994). N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol. Rev.* 74:723-759.
- 28.- **Hollman M. y Heinemann S.** (1993). Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:31-108.
- 29.- **Ishii T., Moriyoshi K., Sugihara H., Sakurada K., Kadotani H., Yokoi M., Akazawa C., Shigemoto R., Mizuno N., Masu M. y Nakanishi S.** (1993). Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* 268:2836- 2843.
- 30.- **Monyer H., Sprengel R., Schoepfer R., Herb A., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakmann B. y Seeburg P.** (1992). Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science.* 256:1217-1221.
- 31.- **Nakanishi N., Axel R. y Schneider N.A.** (1992). Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:8552-8556.
- 32.- **Palmer A.M. Y Burns M.A.** (1994). Preservation of redox, polyamine and glycine modulatory domains of the N-methyl-D-aspartate receptor in Alzheimer's disease. *J. of Neurochem.* 62:187-196.
- 33.- **Goel R., Mishra O.P. y Papadopoulos M.D.** (1994). Effect of dithiothreitol on lipid peroxidation induced modification of NMDA receptor in fetal guinea pig brain. *Neurosc. Lett.* 169:109-113.
- 34.- **Zang J. y Snyder H.** (1995). Nitric oxide in the nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:213-233.
- 35.- **Garthwaite J. y Boulton C.L.** (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.* 57:683-706.
- 36.- **Bredt D.S. y Snyder S.H.** (1994). Nitric Oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 63:175-95.

- 37.- **Szabo C.S.**(1996). Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* 41:131-141.
- 38.- **Griffith O.W. y Stuehr D.J.** (1995). Nitric Oxide Synthases: Properties and catalytic mechanism. *Ann. Rev. Physiol.* 57:707-736.
- 39.- **Förstermann U. y Keinert H.** (1995). Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Arch. Pharmacol.* 352:351-364.
- 40.- **Gross S. S.** (1995). Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Ann. Rev. Physiol.* 57:707-736.
- 41.- **Jones N.M., Loiacono R.E., Moller M. y Beart P.M.** (1994). Diverse roles for nitric oxide in synaptic signalling after activation of NMDA release-regulating receptors. *Neuropharmacol.* 33:1351-1356.
- 42.- **Bruhwyler J., Chleide E., Liégeois J.F. y Carreer F.** (1993). Nitric oxide: A new messenger in the brain. *Neurosc. and Biobehavioral Rev.* 17:373-384.
- 43.- **Hirsch D.B., Steiner J.P., Dawson T.M., Mammen K. y Hayek E.** (1993). Neurotransmitter release regulated by nitric oxide in PC-12 cells and brain synaptosomes. *Curr. Biol.* 3:749-754.
- 44.- **Yun H.Y., Dawson V.L. y Dawson T.M.** (1996). Neurobiology of nitric oxide. *Critical Rev. Neurobiol.* 10:291-316.
- 45.- **Montague P.R., Gancayco C.D., Winn M.J., Marchase R.B. y Friedlander M.J.** (1994). Role of NO production in NMDA receptor mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science.* 263:973-977.
- 46.- **Daw N.W., Stein P.S.G. y Fox K.** (1993).The role of NMDA receptors in information processing. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:207-222.
- 47.- **Molinoff P.B., Williams K., Pritchett D.B. y Zhong J.** (1994). Molecular pharmacology of NMDA receptors: modulatory role of NR2 subunits. *Prog. Brain Res.* 100:39-45.
- 48.- **Choi D.W.** (1988). Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron.* 1:623-624.
- 49.- **Carroza D.P., Ferraro T. N., Golden G.T., Reyes P.F. y Hare T.A.** (1992). In

vivo modulation of excitatory amino acid receptors: microdialysis studies on N-methyl-D-aspartate evoked striatal dopamine release and effects of antagonists. *Brain Res.* 57:42-48.

50.- **Wang J.K.T.** (1991). Presynaptic glutamate receptors modulate dopamine release from striatal synaptosomes. *J. of Neurochem.* 57:819-822.

51.- **Chéramy A., Desce J.M., Godeheu G. Y Glowinski J.** (1994). Presynaptic control of dopamine synthesis and release by excitatory amino acids in rat striatal synaptosomes. *Neurochem. Int.* 25:123-131.

52.- **Jones C.A., Zempléni E., Davis B. y Reynolds G.P.** (1993). Glutamate stimulates dopamine release from cortical and limbic rat brain in vitro. *Europ. J. Pharmacol.* 242:183-187.

53.- **Leviel V., Gobert A. y Guibert B.** (1990). The glutamate-mediated release of dopamine in the rat striatum: further characterization of the dual excitatory-inhibitory function. *Neuroscience* 39(2):305-312.

54.- **Overton P. y Clark D.** (1991). N-methyl-D-aspartate increases the excitability of nigrostriatal dopamine terminals. *Eur. J. Pharmacol.* 201:117-120.

55.- **Gauchy C., Desban M., Glowinski J. y Kemel M.L.** (1994). NMDA regulation of dopamine release from proximal and distal dendrites in the cat substantia nigra. *Brain Res.* 635:249-256.

56.- **Gunasekar P.G., Kanthasamy A.G., Borowitz J.C. y Isom G.E.** (1995). NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: Implication for cell death. *J. of Neurochem.* 65:2016-2021.

57.- **Akira T., Henry D. y Wasterlain C.G.** (1994). Nitric oxide mediates the sustained opening of NMDA receptor-gated ionic channels which follows transient excitotoxic exposure in hippocampal slices. *Brain Res.* 652:190-194.

58.- **Hoyt K.r., Tang L.H., Aizenman E. y Reynolds I.J.** (1992). Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular  $Ca^{2+}$  in cultured rat forebrain neurons. *Brain Res.* 592:310-316.

59.- **Lin A.M.Y., Kao L.S. y Chai C.Y.** (1995). Involvement of nitric oxide in

dopaminergic transmission in rat striatum: an in vivo electrochemical study. *J. of Neurochem.* 65:2043-2049.

60.- **Guevara-Guzman R., Emson P.C. y Kendrick K.M.** (1994). Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J. of Neurochem.* 62:807-810.

61.- **Hanbauer I., Wink D., Osawa Y. y col.** (1992). Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [<sup>3</sup>H]-dopamine from striatal slices. *Neuroreport* 3(5):409-412.

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

63.- **Williams K., Romano C., Dichter M.A. y Molinoff P.B.** (1991). Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci.* 48:469-498.

64.- **Fage D., Voltz C., Scaltot B. y Carter C.** (1992). Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by N-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo. *J. of Neurochem.* 58:2170-2175.

65.- **Scott R.H., Sutton K.G. y Dolphin A.C.** (1993). Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trend in Neurosci.* 16:153-160.

66.- **William K.** (1997). Interaction of polyamines with ion channels. *Biochem J.* 325:289-297.

67.- **Leerma J.** (1992). Spermine regulates N-methyl-D-aspartate receptor desensitization. *Neuron* .8:343-352.

68.- **Rock D.M.** (1995). Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:463-482.

69.- **Tabor C.W. y Tabor H.** (1984). Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53:749-790.

70.- **Ransom R.W. y Stec N.L.** (1988). Cooperative modulation of [3H]-MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines. *J. of Neurochem.* 51:830-836.

71.- **Rock D.M. y Macdonald R.L.** (1992). Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of N-methyl-D-aspartate receptor single channel conductance. *Mol. Pharmacol.* 42:157-164.

- 72.- **Woodward J.J. y Harms J.** (1992). The putative polyamine antagonist and SL 82.0715 enhance dopamine efflux from rat striatal slices on dependent of NMDA receptor activation. *Eur. J. of Pharamacol.* 210:265-270.
- 73.- **Stout A.K. y Woodward J.J.** (1990). Polyamine antagonist inhibit the NMDA-stimulated release of neurotransmitters from rat brain slices. *FASEB J.* 5:A505.
- 74.- **Fage D., Voltz C. y Carter C.** (1993). Ouabain releases striatal polyamines in vivo independently of N-methyl-D-aspartate receptor activation. *J. of Neurochem.* 61:261-265.
- 75.- **Bourdiol F., FageD., Serrano A., Carter C., Benavides J. y Scatton B.** (1991). Neurotoxic effects of intrastrially injected spermine and spermidine. *Fundam. Cin. Pharmacol.* 5:443-446.
- 76.- **Reynolds I.J.** (1990). Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA receptor. *Eur. J. of Pharmacol.* 177:215-216.
- 77.- **Wang J. y Johnson K.M.** (1992). Arcaine and magnesium inhibition of the NMDA receptor ionophore complex: evidence for distinct voltage-dependent sites. *Can.J.Physiol. and Pharmacol.* 70:283-288.
- 78.- **Pullan L.M., Stumpo R.J., Powel R.J., Paschetto K.A. y Britt M.** (1992). Neomycin is an agonist at a polyamine site on the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. of Neurochem.* 59:2087-2093.
- 79.- **Mercer L.D., Jarrott B. y Beart P.M.** (1993). 125I-Ifenprodil : Synthesis and characterization of binding to a polyamines-sensitive site in cerebral cortical membranes. *J. of Neurochem.* 61:120-126.
- 80.- **Subramaniam S. Y McGonigle P.** (1993). Regional heterogeneity of polyamine effects on the N-methyl-D-aspartate receptor in rat brain. *J. of Neurochem.* 60:2276-2284.
- 81.- **Reynolds J.J., Rush E.A. Y Aizenman E.** (1990). Reduction of NMDA receptors with dithiothreitol increases [3H]-MK-801 binding and NMDA-induced Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Br. J. of Pharmacol.* 101:178-182.
- 82.- **Tang L.H. y Aizenman E.** (1993). The modulation of N-methylD-aspartate

receptors by redox and alkylating reagents in rat cortical neurones in vitro. *J. of Physical.* 465:303-323.

83.- **Aizenman E., Lipton S.A. y Loring R.H.** (1989). Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron.* 2:1257-1263.

84.- **Sucher N.J. y Lipton S.A.** (1991). Redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex:regualtion by oxidized glutathione. *J. of Neurosci. Res.* 30:582-591.

85.- **Köhr G., Ecardt S., Lüddens H., Monyer H. y Seeburg P.H.** (1994). NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents. *Neuron.* 12:1031-1040.

86.- **Lei S.Z., Pan Z.H., Aggarwal S.K., Chen H.S.V., Hartman J., Cucher N.J. y Lipton S.A.** (1992). Effect of nitric oxide production of the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron.* 8:1087-1099.

87.- **Tauck D.L.** (1992). Redox modulation of NMDA receptor-mediated synaptic activity in the hippocampus. *Neuroreport.* 3:781-784.

88.- **Sullivan J.M., Traynelis s.F., Chen H.S.V., Escobar w., Heinneman S.F. y Lipton S.A.** (1994). Identification of two cystein residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron.* 13:929-936.

89.- **Zuazaga C., Steinacker A. y Del Castillo J.** (1984). The role of sulfhydryl and disulfide groups of membrane proteins in electrical conduction and chemical transmission. *Puerto Rico Health Sci. J.* 3:125-139.

90.- **Aizenman E. y Hartnett K.A.** (1992). The action of CGS-19755 on the redox enhancement of NMDA toxicity in rat cortical neurons in vitro. *Brain Res.* 585:28-34.

91.- **Aizenman E.** (1995). Modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by hydroxyl radicals in rat cortical neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* 189:57-59.

92.- **Hammer B., Parker W.D. y Bennett J.P.** (1993). NMDA receptors increase OH radicals in vivo by using nitric oxide synthase and protein kinase C. *Neuroreport.* 5:72-74.

93.- **Chaparro-Huerta V., Beas-Zárate C., Ureña-Guerrero M. y Feria-Velasco A.** (1997). Nitric Oxide involvement in regulating the dopamine transport in the striatal

region of rat brain. *Neurochem. Int.* 31:607-616.

94.- **Roberts P.J. y Anderson S.D.** (1979). Stimulatory effect of L-glutamate and related amino acids on [<sup>3</sup>H]dopamine release from rat striatum: an *in vitro* model for glutamate actions. *J. Neurochem.* 32:1539-1545.

95.- **Amalric m., Ouagazzal A., Baunez C. y Nieoullon A.** (1994). Functional interactions between glutamate and dopamine in the rat striatum. *Neurochem Int.* 25:123-131.

96.- **Snyder S.H. y Brett D.S.** (1992). Biological Roles of nitric oxide. *Scientific American* . 28-35.

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

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

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

100.- **Subramaniam S. y McGonigle P.** (1994). Regional profile of development changes in the sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines. *J. of Neurochem.* 62:1408-1415.

101.- **Chesselet M.F.** (1984). Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: Facts and hypothesis. *Neuroscience.* 12:347-375.

102.- **Ennis C. y Cox B.** (1981). GABA enhancement of [<sup>3</sup>H]-dopamine release from slices of rat striatum: dependence on slice size. *Eur. J. Pharmacol.* 70:417-420.

103.- **Westfall T.C.** (1982). Inhibition of the electrically induced release of [<sup>3</sup>H]-dopamine and serotonin from superfused rat striatal slices. *Neurosci.Lett.* 28:205-209.

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

- 105.- **Whittaker U.P. y Barker L.A.** (1972). The subcellular fractionation of brain tissue with special references to the preparation of sinaptosomes and their component organelles. In *Methods of Neurochemistry*. Vol.2. (Fried R.L. ed.), p.p. 1-52. Dekker, New York.
- 106.- **Beas-Zárate C., Schliebs R., Morales-Villagrán A., y Feria-Velazco A.** (1989). Mono-sodium L-glutamate induced convulsion changes in uptake and release of catecholamines in cerebral cortex and caudate nuclei of adult rats. *Epilepsy Res.* 4:20-27.
- 107.- **Grace A.A.** (1991). Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsibility: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neurosci.* 41:1-24.
- 108.- **Chavez-Noriega L., Patino P. y Carcia-Muñoz M.** (1986). Excitability changes induced in the striatal dopamine-containing terminals following frontal cortex stimulation. *Brain Res.* 379:300-306.
- 109.- **Chéramy A., Barbeito L., Godeheu G., Desce J.M., Pitaluga A., Galli T., Artaud F. y Glowinsky J.** (1990). Respective contributions of neuronal activity and presynaptic mechanisms in the control of the in vivo release of dopamine. *J. Neural. transm.* 29:183-193.
- 110.- **Garthwaite J., Southam E. y Anderton M.** (1989). A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J. of Neurochem.* 53:1952-1954.
- 111.- **Scott R.H., Sweeney M.I., Kobrinsky E.M., Pearson H.A. y Tims G.H.** (1992). Actions of arginine polyamine on voltage and ligand-activated whole cell currents recorded from cultured neurones. *Br. J. Pharmacol.* 106:199-207.
- 112.- **Borson J.R., Manzollillo P.A. y Miller R.J.** (1994).  $Ca^{2+}$  entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity cultured cerebellar purkinje cells. *J. of Neurosci.* 14:187-197.
- 113.- **Williams K., Dawson V.L., Romano C., Dichter M.A. y Molinoff P.B.** (1990). Characterization of polyamines having agonist, antagonist and inverse agonist effects as the polyamine recognition site of the NMDA receptor. *Neuron.* 5:199-208.

- 114.- **Munir M., Subramaniam S. y McGonigle P.** (1993). Polyamines modulate the neurotoxic effects of NMDA in vivo. *Brain Res.* 616:163-170.
- 115.- **Williams K.** (1994). Mechanisms influencing stimulatory effects of spermine at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.* 46:161-168.
- 116.- **Lynch D.R., Lawrence J.J., Lenz S., Anegawa N.J., Dichter M y Pritchett D.B.** (1995). Pharmacological characterization of heterodimeric NMDA receptors composed of NR1a and 2B subunits: Differences with receptors formed from NR1a and 2A. *J. of Neurochem.* 64:1462-1468.
- 117.- **Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A., Mullins M.E., Jaraki O., Michel T., Singe D.J. y Loscalzo J.** (1992). S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:444-448.
- 118.- **Moriyoshi K., Masu M., Ischii T., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S.** (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature.* 354:31-36.
- 119.- **Gilbert K.R., Aizenman E. y Reynolds I.J.** (1991). Oxidized glutathione modulates N-methyl-D-aspartate and despolarization-induced increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> in cultured rat forebrain neurons. *Neurosci. Lett.* 133:11-14.